

Szakdolgozat

Hemopoietikus antigén T és szelektív B lymphocytákon

Készítette: **Fejszák Nóra Florina**

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Biológus szak

Témavezető: Dr. Nagy Nándor, Ph.D, egyetemi adjunktus

Semmelweis Egyetem, Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet

Fejlődésbiológiai és Immunológiai Laboratórium

Belső konzulens: Dr. László Lajos, CSc., egyetemi docens

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék



Budapest, 2011

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítés jegyzék	4
Bevezetés	6
Irodalmi áttekintés	7
1. A madarak jellegzetes primer nyirokszerve: a bursa Fabricii	7
1.1. A bursa Fabricii immunológiai jelentősége	7
1.2. A bursa Fabricii általános felépítése.....	7
1.3. A bursa Fabricii fejlődése	9
1.4. A bursa folliculusok szöveti szerkezete.....	12
2. A madarak B lymphocytáira jellemző molekulák	14
Célkitűzések	19
Anyagok és módszerek	20
1. Kísérleti állatok.....	20
2. A minták szövettani feldolgozása	20
2.1. Zselatin-szacharózos fagyasztott blokk készítése	20
2.2. Májba ágyazott fagyasztott blokk készítése	21
2.3. Beágyazáshoz használt oldatok	21
3. Metszetek készítése	21
4. Vérkenet készítés	22
5. Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia.....	22
5.1. Immunhisztokémia	22
5.2. Immunfluoreszcencia.....	23
5.2.1. Egyszeres immunfluoreszcens festés	23
5.2.2. Kettős immunfluoreszcens festés.....	23
5.3. Az immunfestés során alkalmazott primer és szekunder ellenanyagok, előhívószer- oldatok	24
5.3.1. Primer ellenanyagok.....	24
5.3.2. Szekunder ellenanyagok.....	25
5.3.3. Felhasznált oldatok, előhívószer- oldatok	25
6. Metszetek értékelése, fényképezése, képfeldolgozás	25
7. Gélelektroforézis és Western-blot.....	26

7.1. Minta.....	26
7.1.1. Thymus lizátum készítés	26
7.1.2. A minta előkészítése a blottoláshoz	26
7.2. Gélek összemérése.....	26
7.3. SDS gélelektroforézis, futtatás	28
7.4. Blottolás nitrocellulóz membránra	28
7.5. Festés	29
7.6. A lizátum készítéshez és a western-blotthoz használt oldatok, előhívószerek	29
Eredmények.....	31
1. A 7H3 ellenanyaggal jelölt sejtek eloszlásának meghatározása kifejlett gyöngytyúk primer nyirokszerveiben (bursa Fabricii, thymus).....	31
2. A 7H3 antigén expressziója kifejlett állatok szekunder nyirokszerveiben	34
3. A 7H3 antigén sejtbeli lokalizációjának meghatározása.....	37
4. A 7H3-pozitív sejtek vizsgálata az embrionális fejlődés során	38
4.1. A 7H3-pozitív sejtek megjelenése a korai embrióban.....	38
4.2. A 7H3 expressziója a bursa Fabricii fejlődése során.....	41
5. A 7H3 antitest által jelölt antigén molekulatömegének meghatározása	44
Megbeszélés.....	45
Következtetések	50
Összefoglalás.....	51
Summary.....	52
Köszönetnyilvánítás.....	53
Irodalomjegyzék	54

Rövidítés jegyzék

ABC: avidin-biotin-peroxidáz komplex

APS: ammónium-perszulfát

BAFF: B-cell activating factor = B-sejt aktiváló faktor

BCR: B cell receptor = B-sejt antigénkötő receptor

BSA: Borjú Szérum Albumin

BSDC: bursal secretory dendritic cell = bursai szekréción dendritikus sejt

CD: cluster of differentiation

Ch: chicken = csirke

CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 = citotoxikus T lymphocytá antigén 4

DAPI: 4,6 diamidino-2-fenilindol

DSHB: Developmental Studies Hybridoma Bank

ED: embrionális nap

FAE: follicle-associated epithelium = folliculus-asszociált epithelium

g: gravitációs gyorsulás

HEMCAM/ CD146: hemopoietikus sejtekre jellemző adhéziós molekula

HH: Hamburger-Hemilton szerinti stádiumbeosztás

IFE: interfollicular epithelium = interfollikuláris epithelium

IL-2: interleukin-2

MHC: main histocompatibility complex = fő hisztokompatibilitási komplex

PALS: periarteriolar lymphocyte sheath = periarterioláris lymphoid hüvely

PBL: peripheral blood lymphocyte = perifériás vér lymphocytá

PBS: foszfáttal puffereált sóoldat

PELS: periellipsoid lymphocyte sheath = periellipszoidális lymphoid hüvely

PFA: paraformaldehid oldat

SDS: szódium-dodecil-szulfát

TEMED: tetrametil-etilén-diamin

TCR: T cell receptor = T sejt receptor

UTV: ultratiszta víz

$\alpha\beta$ T sejt: $\alpha\beta$ T sejt receptort hordozó T lymphocyt

$\gamma\delta$ T sejt: $\gamma\delta$ T sejt receptort hordozó T lymphocyt

Bevezetés

Napjainkban a monoklonális ellenanyagokat széles körben alkalmazzák mind az alapkutatásokban, mind a klinikai diagnosztika területein. A monoklonális ellenanyagok egy-egy B-sejt klón utódsejtjeinek a termékei, amelyek minden szempontból (izotípus, affinitás, specificitás) azonos molekulák. Előállításukra *in vitro* körülmények között a hibridoma (szomatikus sejthibridizációs) technika alkalmas, amely lehetővé teszi, hogy egy adott ellenanyagot termelő, de az élő szervezetben korlátozott élettartamú immunsejt, egyedileg kiválasztható és szaporítható legyen. A technika kidolgozásáért Köhler és Milstein 1975-ben Nobel-díjat kapott. A megfelelően karakterizált antitestek, ma már rutinszerűen használt eszközök a különböző sejtípusok azonosítására, szöveten belüli előfordulásának vizsgálatára, illetve a fejlődésbiológiai kutatásokban egy adott sejtípus eredetének és differenciálódásának nyomon követésére.

Laboratóriumunkban a korábbi években nagyszámú, olyan egér monoklonális ellenanyag készült, amelyeket a madarak hemopoiitikus és lympho-myeloid szerveinek tanulmányozására és ezek fejlődésének vizsgálatára alkalmazunk. A madár, mint kísérleti állat mellett számos érv szól. Egyedülálló primer nyirokszervük, a B lymphocyták éréséért és differenciálódásáért felelős bursa Fabricii miatt, kiváló modellek a B sejtek fejlődésének tanulmányozására. A T és B sejtek immunrendszerben betöltött alapvető funkcionális különbségeit is legelőször csirkében tisztázták. Ezen kívül rövid idejű embrionális fejlődésük és az embriók könnyű hozzáférhetősége lehetővé teszi a szervelept-transzplantációk, kiméra-kísérletek alkalmazását. A megfelelő hemopoiitikus sejteket jelölő fajspecifikus monoklonális ellenanyagok és a kiméra-módszerek ötvözése pedig alkalmas a vérképzés és a lympho-myeloid sejtek differenciálódásának tanulmányozására, amely a haematológiai betegségek nagy száma és változatossága miatt gyakorlati jelentőséggel is bír.

Kísérletes munkámban egy olyan gyöngytyúk specifikus monoklonális ellenanyag immuncitokémiai és biokémiai karakterizálását végeztem, amely embrióban hemopoiitikus sejteket, felnőtt állatokban T lymphocytákat és a bursa Fabricii B lymphocytáinak egy szubpopulációját jelöli.

Irodalmi áttekintés

1. A madarak jellegzetes primer nyirokszerve: a bursa Fabricii

1.1. A bursa Fabricii immunológiai jelentősége

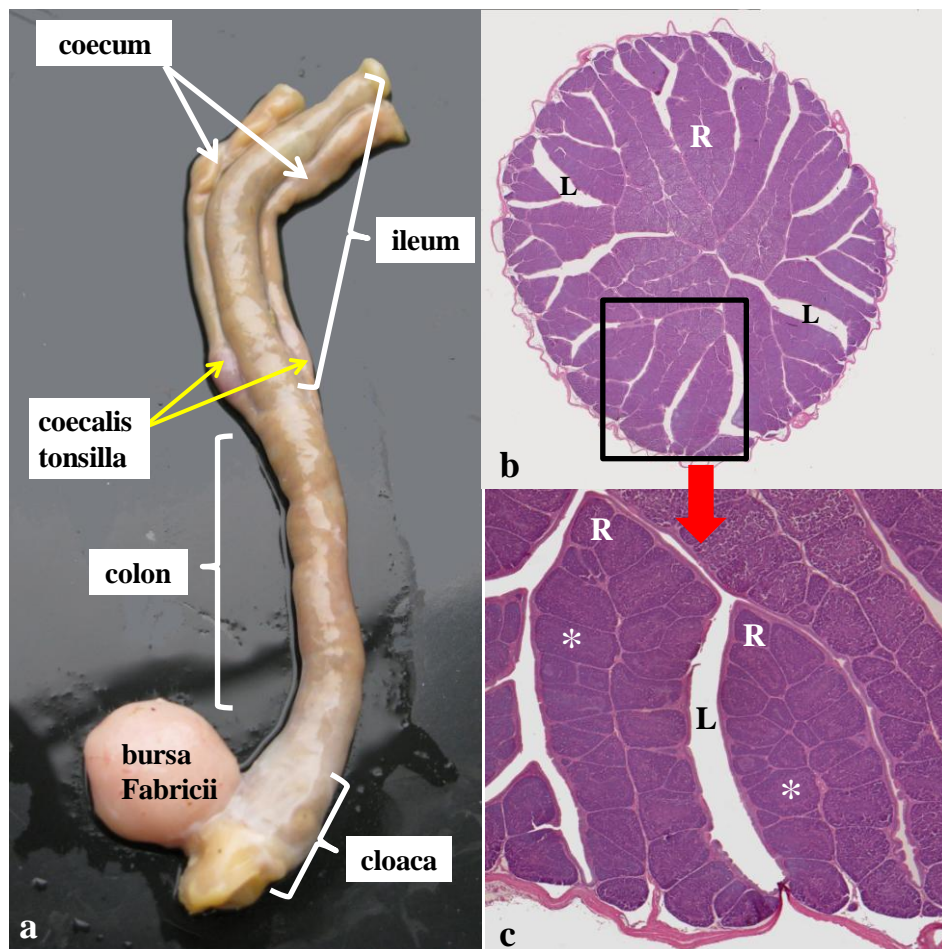
A bursa Fabricii humorális immunitás kialakításában betöltött szerepét Bruce Glick ismerte fel először. 1956-ban számolt be bursectomiás (bursa eltávolítás) kísérleteiről, amelyek alapján arra következtetett, hogy a bursa Fabricii részt vesz az antigén-specifikus ellenanyagok termelésében (Glick és mtsai, 1956). Nem sokkal később Warner és Szenberg (1962) javaslatára a thymus és a bursa különböző hatásmechanizmusa alapján, a csirke immunrendszerét funkcionálisan két részre különítették. Ez vezetett az immunitás disszociációs elméletének megszületéséhez, miszerint a sejtközvetített immunválaszt a T (thymus eredetű) lymphocyták, az ellenanyag közvetítette immunválaszt pedig a B (bursa eredetű) lymphocyták végzik. Ezután kezdtek el meghatározni emlősökben az úgynevezett bursa–equivalens szerveket, amelyek közé a juh ileális Peyer-plakkjai, a nyúl appendixe, valamint emberben és a többi emlősben a csontvelő tartozik (Reynaud és mtsai, 1991; Weinstein és mtsai, 1994).

A bursa Fabricii tehát a madarak olyan primer nyirokszerve, amely kritikus szerepet játszik a B lymphocyták fejlődésében, differenciálódásában és szelekciójában. Ezért vált a B sejt fejlődésre irányuló biológiai kutatások egyik legjobban tanulmányozott modellévé.

1.2. A bursa Fabricii általános felépítése

A bursa Fabricii kifejlett csirkében 1,5-1,7 cm átmérőjű redőket tartalmazó üreges szerv, amely kivezető csövén keresztül a kloáka proctodeumával állandó összeköttetésben van (Boyden, 1922; Oláh és mtsai, 1986). Kívülről zsírsejtekben gazdag adventitia borítja. Falát belső körkörös és külső hosszanti simaizomréteg alkotja, amely összefügg a kloáka izomrétegével. A bursa lumene harántmetszeti képen csillag alakú, az üregébe bedomborodó 12-16 hosszanti lefutású redő miatt (1/b kép). Az egyes redők 5-7 mm magasak, 2-3 mm szélesek és 12-15 mm hosszúak. Ezt a méretet 4-6 hetes korú csirkében lehet megfigyelni, amikor a bursa gyors növekedése (a testsúly gyarapodásához viszonyítva) befejeződik (Oláh és Glick, 1978). A redők kötőszövetébe nagyszámú, B lymphocytákkal feltöltött folliculus ágazódik (1/c kép), amelyek a bursa Fabricii funkcionális és szerkezeti alapegységei (Sayegh és mtsai, 2000). A folliculusok elhelyezkedése szabályos, a redők kötőszövetes tengelyében húzódó erek (artériák, vénák, nyirokerekek) két oldalán, a lument bélelő epitheliumhoz

asszociáltan lokalizálódnak. Felnőtt állatokban nagyobb terjedelmű centrális velőállományból és keskenyebb marginális, kéregállományból épülnek fel. Ez a szerkezeti felépítés a kikelést követő hetekben válik teljessé, mivel az embrionálisan megjelenő bimbók a felnőttkori folliculusok velőállományának feleltethetők meg, és a kéregállomány differenciálódása közvetlenül a kikelés előtt néhány nappal kezdődik. A bursa Fabricii nem állandó szerve a madarak szervezetének, körülbelül 23 hetes korra teljesen eltűnik (Naukkarinen és Sorvari, 1984).



1. kép: A bursa Fabricii anatómiája és általános szövettani szerkezete. a.) A bursa Fabricii a vastagbél dorsalis oldalán, a cloaca proctodeum részéhez csatlakozva található. b.) A bursa kis nagyítású hematoxilín-eosin festett keresztmetszeti képen a hámsejtekkel borított redők (R) különböztethetők meg. A bursa üregbe domborodó redők miatt a lumen (L) csillag alakú. c.) A bursa redőit (R) lymphoid folliculusok (csillag) töltik ki.

1.3. A bursa Fabricii fejlődése

A bursa Fabricii fejlődésére számos irodalmi adatot találunk (Oláh és mtsai, 1992; Nagy és mtsai, 2001; Nagy és mtsai, 2004a, 2004b; Nagy és Oláh, 2010). A legtöbb tanulmányt csirke embrión végeztek, de néhány publikáció már született egyéb fajokra, így gyöngytyúk és fűj embriókra vonatkozóan is (Nagy és mtsai, 2001; Nagy és mtsai, 2004a). A gyöngytyúkok tojásból való kikelése a csirkékhez képest 5-6 nappal később (26-27 napra) történik. Ez a pár nap eltolódás kivétel a bursa Fabricii hisztológiai fejlődésére is, habár a folyamat lépései teljesen azonosak a csirkében leírtakkal. Mivel a gyöngytyúkok bursájának fejlődéséről kevesebb irodalmi adatot ismerünk (1. táblázat), ezért a továbbiakban a bursa fejlődésére megadott időpontok csirkére vonatkoznak (Glick, 1988).

1. táblázat: Jellegetes stádiumok detektálhatósága a bursa Fabricii fejlődése során, gyöngytyúk és csirke embrióban.

Főbb stádiumok	gyöngytyúk¹	csirke
Bursa epithelialis telepének a megjelenése	7 ED	5 ED
Redők képződésének időpontja	14 ED	10 ED
Dendritikus prekurzor sejtek megjelenése a mesenchymában	12 ED	9 ED
Follikulus bimbók indukciója	16 ED	11-12 ED
Bu-1 pozitív B sejtek megjelenése a follikulus bimbókban	16-17 ED ²	12-13 ED

¹Nagy és mtsai, 2001

²Saját megfigyelés alapján

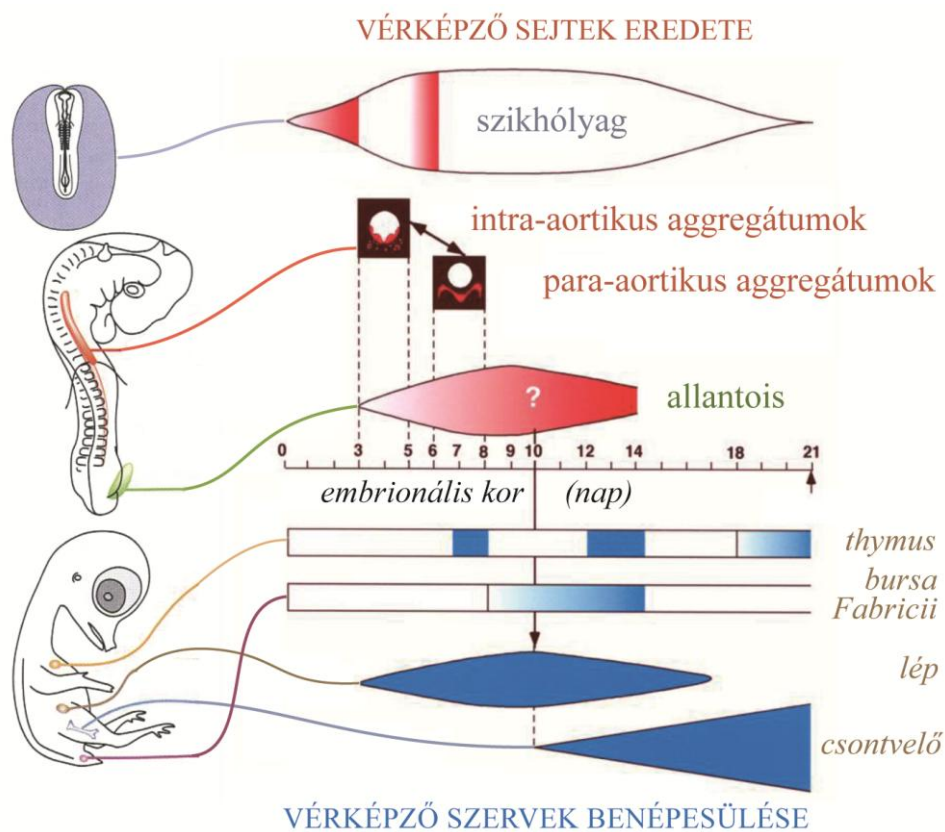
ED: embrionális nap

Csirkében a bursa epithelialis telepe az embrionális fejlődés 5. napján jelenik meg az ectodermális eredetű proctodeum és az entodermális hámmal bélelt urodeum határán. A dorsalis mesenchymába belenövő hámcsoport belseje kezdetben tömör, teljes egészét hámszövetek töltik ki. Idővel a belső sejtek apoptózissal elpusztulnak, helyükön vakuolumok keletkeznek, majd ezek összenyílásával üreg képződik (Oláh és mtsai, 1986). A bursa epithelialis kezdeményének ectodermális eredetét embriómanipulációs kísérletek alapján sikerült bizonyítani (Nagy és Oláh, 2010). A mesenchyma sejtek intenzív proliferációja miatt, a 10. naptól kezdve már megjelennek a bursa lumenébe domborodó, hámmal fedett redők. A fejlődő szervtelepbe, annak vaszkularizációja után hemopoietikus sejtek vándorolnak (Le Douarin és mtsai, 1975).

A lymphoid szerveket így: thymust, lépét, bursát, csontvelőt különböző időpontokban lymphoid és myeloid prekurzor sejtek kolonizálják (2. kép). A bevándorló előalakok a dorsalis mesenteriumban megjelenő, úgynevezett para-aortikus hemopoietikus sejtekből származnak (Lassila és mtsai, 1979; Dunon és mtsai, 1999). A para-aortikus régiót, az intra-

aortikusan megjelenő hemopoietikus sejtek dorsalis mesenteriumba való belépésükkel hozzák létre (Jaffredo és mtsai, 2000). Az intra-aortikus klaszter az aorta lumenébe domborodva/bimbózva két ventrolaterális vagy egyetlen ventromediális hosszanti redőként figyelhető meg, az embrionális fejlődés 3-4 napja között (Jaffredo és mtsai, 1998).

A bursa Fabricii prekursor sejtek általi kolonizációja két hullámban, a 8-14. embrionális napok között történik (Nagy és mtsai, 2004b). A myeloid prekursor sejtek bevándorlása miatt a 9. embrionális naptól, a fejlődő bursa hám alatti mesenchymájában két jellegzetes sejtípust különíthetünk el: a világos mesenchyma sejteket és az orsó alakú, vérkeringésből származó ún. sötét sejteket. A sötét sejtek elnevezésüket toluidin kézzel festett félvékony metszeten adott, erős basophil festődésükről kapták.



2. kép: A vérképző rendszer fejlődése csirke embrióban. A kép az embrionális kor függvényében ábrázolja a vérképző sejtek keletkezésének a helyét illetve a különböző lympho-myeloid célszervek kolonizációs időintervallumát. (Forrás: Minkó Krisztina után módosítva; Minkó, 2005)

Ezek a sejtek csirkében a CD45 (közös leukocytá antigén) és 74.3 (csirke dendritikus sejt marker) antigéneket fejezik ki (Nagy és mtsai, 2004b; Nagy és Oláh, 2010), míg gyöngytyúkban és fürjben, QH1 (hemopoietikus sejt és endothel marker) és N1C2 (dendritikus sejt marker) antigéneket expresszálnak (Nagy és mtsai, 2001). A 10. embrionális

napon közvetlenül a bursa lumenét bélelő hám alatti mesenchymában a CD45+/74.3+ sejtek kis csoportokat alkotnak, majd a 11-12. napon átlépik a hámréteg alaphártyáját, és a hámsejtek közé vándorolnak (Oláh és mtsai, 1986; Lupetti és mtsai, 1986). Belépésük helyén a hámsejtek intenzív osztódásba kezdenek, a mesenchyma irányába bimbóznak, miközben az alaphártyát maguk előtt tolva, kezdetét veszi a leendő follikulusok kialakulása. A fejlődő bimbók a felnőtt bursai follikulusok velőállomány kezdeményeinek tekinthetők, és csak azokon a helyeken képződnek, ahol a CD45+/74.3+ sejtek a hámba vándoroltak. Immuncitokémiai és embriómanipulációs kísérletek alapján a 74.3+ és N1C2+ bursai follikulusokat indukáló sötét sejtekből később a bursa szekréción dendritikus sejtjei (BSDC) differenciálódnak (Nagy és mtsai, 2004b).

A második hullámban hemopoietikus eredetű, B lymphocytá prekursorok érkeznek a fejlődő bursa telepébe (Nagy és mtsai, 2004b). A B sejtvonal irányú differenciálódás első megnyilvánulása csirkében, az immunglobulin gének átrendeződése, valamint a sejtfelszíni chB6 (Bu-1) molekula megjelenése, amelyet a későbbi érett sejtek is kifejeznek (Houssaint és mtsai, 1989). A bursát kolonizáló B sejt prekursorok először a redők mesenchymájába lépnek be. Az elköteleződő sejtek migrációját a felszínükön expresszálandó szelektin ligand, a szialil Lewis^x segíti (Masteller és mtsai, 1995a), illetve feltehetőleg, a HEMCAM sejtadhéziós molekulának is szerepe lehet a prekursor sejtek homingjában (Vainio és mtsai, 1996). A sikeres génátrendeződés befejeztével a B lymphocytá előalakok IgM-t fejeznek ki, amely a B sejt receptorkomplex (BCR) részeként jelenik meg a sejtfelszínen (Sayegh és mtsai, 2000). Ezt követően az embrionális élet 12-15. napja között, egy-egy fejlődő follikulus bimbóba mindössze 2-3 (IgM+/Bu-1+) B sejt prekursor lép be (Pink és mtsai, 1985; Ratcliffe és mtsai, 1986). A hámsejtekkel tömött follikulus bimbó sejtjei közé furakodva és azokkal kontaktusba kerülve, a B sejtek intenzív osztódásba kezdenek, amelynek következményként a hámsejtek fokozatosan nyúlványossá, csillag alakúvá válnak, retikulum sejtekké differenciálódnak. A prekursorok osztódásával párhuzamosan génkonverziós folyamatok zajlanak le, amelynek eredményeként alakul ki a madarak diverz immunglobulin repertoárja. Olyan molekula(ák), amely előidézi(k) ezt a gyors sejtosztódási folyamatot még nem ismert(ek). A közelmúltban azonosították az emlős B sejt aktiváló faktor (BAFF) csirke homológját (chBAFF), amely magas expressziós szintet mutat a bursában (Schneider és mtsai, 2004). A chBAFF-ről bebizonyosodott, hogy madarakban fontos szerepet játszik a korai B sejt fejlődésben és proliferációban (Kothlow és mtsai, 2007).

A kikelés előtt néhány nappal a génkonverzió átteszt B lymphocyták a velőállományból, a kéreg-velő határ hámsejtjeinek alaphártyáján áthatolva, kilépnek a

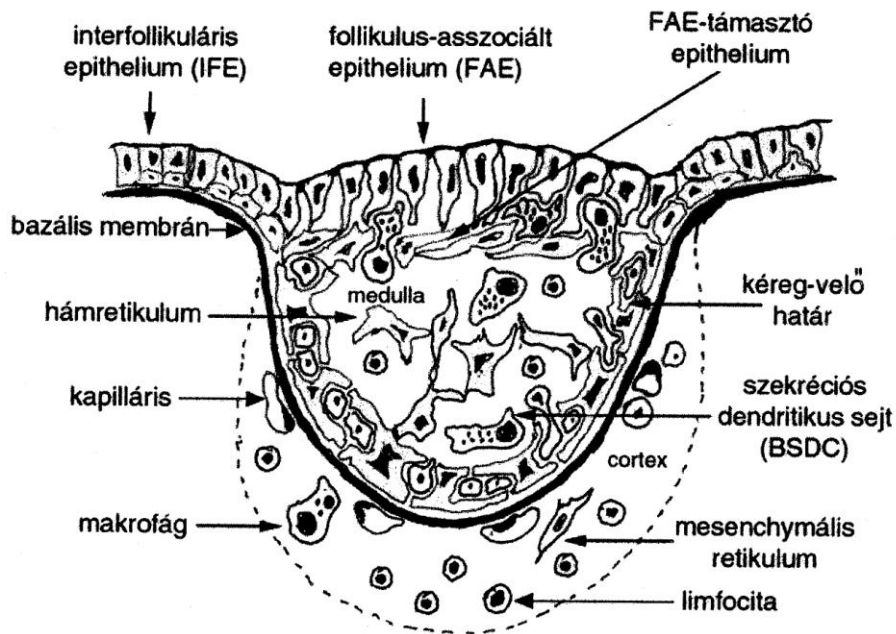
mesenchyma sejtek közé és kialakítják a kéregállományt (Sayegh és mtsai, 2000). A kikelést követően a legtöbb bursális sejt osztódása a kéregállományban zajlik, a velőállomány osztódó sejteket csak kis számban tartalmaz (Reynolds, 1987). Feltehetőleg a bursa eredetű B lymphocyták közvetlenül a folliculusok kéregállományából lépnek ki és vándorolnak a szekunder nyirokszervekbe (Paramithiotis és Ratcliffe, 1994). Számos kísérlet bizonyítja, hogy fiatal állatok bursájában nap mint nap keletkező B lymphocytáknak csak mintegy 5%-a emigrál a perifériára, a többi valószínűleg apoptózissal elpusztul (Lassila, 1989; Paramithiotis és Ratcliffe, 1994).

1.4. A bursa folliculusok szöveti szerkezete

Kikelés után a bursai redők felszíni hámborításának mintegy 90%-át az úgynevezett interfollikuláris epithelium (IFE) adja (3. kép), amely basalis membránon ülő hengerhámsejtekből és differenciálatlan, a felszínt el nem érő hámsejtekből áll (Romano és mtsai, 1996). Elektronmikroszkópos felvételek alapján tudjuk, hogy a hengerhámsejtek apikális felszíne mikrobolyhokkal tagolt és nagyszámú mucint tartalmazó granulum lokalizálódik bennük. A maradék 10% körüli hámfelszínt a folliculus-asszociált epithelium (FAE) borítja, amely a folliculusok velőállományát zárja le a bursa lumen felőli oldaláról (3. kép). Morfológiáját tekintve a FAE-t egyrétegű, piramis alakú sejtek alkotják. Apikális felszínük kiszélesedő, ritkábban álló mikrobolyhokat hordoz, basolaterálisan viszont a sejtek elkeskenyednek. Mucint nem termelnek és morfológiailag egyedülálló jellegzetességük, hogy nincs alattuk alaphártya. Alátámasztásukat az alattuk 3-5 sejtsorban elhelyezkedő ellaposodott hámsejtek (ún. FAE-támasztó epithelium sejtjei) végzik, amelyek desmosomákon keresztül kapcsolódnak a velőállomány hámrétikulumához (Nagy és mtsai, 2001; Nagy és mtsai, 2004a). A FAE biztosítja a folliculus velőállománya és a bursa lumene közötti ellenőrzött anyagforgalmat. A FAE sejtjei a lumenből antigéneket kötnek meg, amelyeket transzcitózissal továbbítanak a folliculus velőállományába (Bockman és mtsai, 1983). Feltételezések szerint a felvett antigének a B sejtek érésének irányításában vesznek részt, valószínűleg a szekréciosis dendritikus sejtek (BSDC, lásd később) közvetítésével.

A bursai folliculusokban előforduló harmadik hámtípus a velőállomány vázát alkotó retikuláris hám, amely a bursa lumenét bélelő hengerhámából differenciálódik a folliculus bimbók fejlődése során. A sejtek nyúlványosak, csillag alakúak egymáshoz desmosomákon keresztül kapcsolódva háromdimenziós hálózatot hoznak létre. A velőállomány szélén lokalizálódó sejtek nyúlványokkal nem rendelkeznek, ellaposodottak, a velőállomány felé árkádokat képeznek és az alattuk húzódó alaphártya folytonos a felszíni IFE alaphártyájával.

Ezek a sejtek képezik a kéreg- és velőállományt elválasztó ún. kortiko-medulláris hámsejt réteget (3. kép). A kortiko-medulláris hámsejteken keresztül intenzív lymphocita migráció folyik a velő-és kéregállomány között (Oláh és mtsai, 2002; Nagy és mtsai 2004a).



3. kép: *A bursa folliculus sémás szövettani szerkezete.* (forrás: Nagy N, Magyar A, Dávid C, Gumati MK, Oláh I. (2001). Development of the follicle-associated epithelium and the secretory dendritic cell in the bursa of fabricius of the guinea fowl (*Numida meleagris*) studied by novel monoclonal antibodies. *Anat Rec.* 262:279-92.)

A velőállomány egy másik jellegzetes sejtípusát a szekréción dendritikus sejteket (bursal secretory dendritic cell, BSDC) először Oláh és Glick írta le 1978-ban. Szerkezetük eltér az emlősöknél leírt dendritikus sejtektől. A szekréción dendritikus sejtek általában hosszan elnyúltak, két aszimmetrikus nyúlvánnyal rendelkeznek, citoplazmatikus organelleik elhelyezkedése nem egyenletes, polarizáltságot kölcsönöz a sejteknek. Az egyik nyúlvány fejlett durva felszínű endoplazmás retikulumot, Golgi-apparátust, és nagyszámú granulumot tartalmaz. A másik sejtnyúlvány granulumokat nem tartalmaz, citoplazmatikus organellemben szegény, főleg intermedier filamentumok töltik ki. A filamentumokat vimentin képezi (Oláh és mtsai, 1992), hasonlóan más dendritikus sejtekhez, illetve a bőr Langerhans sejtjeihez. Nevüket szekréción tevékenységükről kapták, amelyre a sejtek felszínén membránhoz kötötten megjelenő, sűrű elektrondenz anyag utal,

amelynek mennyisége a granulomok számával arányosan változik (Oláh és Glick, 1987). A szekrécios dendritikus sejtek eredetüket tekintve, a folliculusokat indukáló, CD45+ hemopoietikus eredetű sötét sejtekből differenciálódnak és a vimentin mellett NIC2 és 74.3 antigéneket is expresszálnak (Nagy és mtsai, 2004a, 2004b). A kikelést követően a sejteket felszíni IgG és MHCII pozitívitás is jellemzi. A fehérjék szintézisének vizsgálatai során kiderült, hogy ezen sejtek az IgG-t nem termelik, csupán felszínükön immunkomplex formájában megkötik (Felföldi és mtsai, 2005).

A felnőtt állatok folliculusainak kéréggállománya, a velőállomány hámreticulumával ellentétben, mesenchymából származó, retikulum sejtekből (desmin+/vimentin+) áll (Oláh és Glick, 1995). A B sejtek mellett, elszórtan T sejteket (<5%), macrophagokat és granulocytákat is tartalmazhat (Kim és mtsai, 2000). A lymphocyták elszállításában a kéreg- és velőállomány határán lévő gazdag kapilláris hálózat, valamint a nyirok kapillárisok felelősek, bár ezek sosem lépnek be a folliculusok belsejébe (Ekino és mtsai, 1979).

2. A madarak B lymphocytáira jellemző molekulák

A bursai folliculusokban lokalizálódó sejtek túlnyomó többsége B lymphocytá. Az elmúlt három évtizedben immunológiai tanulmányozásukhoz és detektálásukhoz számos madár specifikus monoklonális ellenanyag készült. Ezek nagy segítséget nyújtanak a B sejtek fejlődésének nyomon követésében és a differenciálódási stádiumaik meghatározásában.

chB6/Bu-1

Genetikailag polimorf sejt felszíni antigén, amely a madarak prekursor és érett B sejtjein (kivételet képezve a plazma sejteket) expresszálódik, valamint a macrophagok egy szubpopulációja is kifejezi (Houssaint és Pink, 1987; Weber, 2000). A Bu-1 molekula a sejt felszínen homodimerként előforduló, 70 kDa-os transzmembrán proteín, amely konzervált intracelluláris és erősen glikozilált extracelluláris doménekből áll (Tregaskes és mtsai, 1996). Két izotípusa különíthető el: Bu-1a és Bu-1b. Funkcionális vizsgálatok arra utalnak, hogy egy sejt felszíni halál receptorról van szó (Pifer és mtsai, 2002; Funk és mtsai, 2003), amely valószínűleg közvetlen kapcsolatban van a kaszpázok rendszerével (Funk és Palmer, 2003). Feltehetőleg ligand molekuláját a bursa epithelialis sejtjei expresszálják, így a Bu-1 proteín fontos szerepet tölt be a B sejtek túlélésében, mind embrionálisan, mind a kikelést követően. A Bu-1-nek megfelelő emlős homológot a jelenlegi szakirodalomból még nem ismerünk. Napjainkig több Bu-1 specifikus monoklonális ellenanyag is készült: így a Bu-1b izotípust

felismerő 11G2 (Veromaa és mtsai, 1988), a Bu-1a izotípust jelölő L22 (Pink és Rijnbeek, 1983). Mindkét izotípust felismerő antitestek: az AV20 (Rothwell és mtsai, 1996), a HIS-C1 (Jeurissen és Janse, 1998) és a BoA1 (Igyártó és mtsai, 2008).

EIV-E12

Csirkében az EIV-E12 monoklonális ellenanyag a bursai szekrécios dendritikus sejtek prekursorait jelöli elsőként, amelyek a folliculus formáció megjelenése előtt, szorosan az epithelialis-mesenchymális határ alatt lokalizálódnak (Pharr és mtsai, 1995). A B sejt prekursorok csak a bimbókba való belépésüket követően kezdik meg az EIV-E12 antigén expresszióját, így a továbbiakban ez az antitest már nem alkalmas a folliculusokon belüli dendritikus sejtek nyomon követésére (Nagy és mtsai, 2001). Az EIV-E12 ellenanyag a felnőtt állat valamennyi B lymphocytáját és plazma sejtjeit jelöli, valamint a lép periellipszoidális régiójának, ellipszoid-asszociált sejtjeinek prekursorait és/vagy sejtjeit is felismeri. Az EIV-E12 antitest IgG1 izotípusú, az általa jelölt antigén molekulatömege redukív kondíciók mellett 205 kDa (Pharr és mtsai, 1995).

LT2

Embrionálisan az LT2 antigént valamennyi bursális B sejt expresszálja, míg felnőtt állatokban a perifériás B sejtek többségén, illetve a bursai folliculusok kéregállományi sejtjein van jelen (elszórta néhány LT2+ sejt megfigyelhető a medullában is). Paramithotis és Ratcliffe a perifériás B sejtek 3 szubpopulációját különítették el, melyből az 1-es szubpopuláció sejtjei jelölhetők az LT2 ellenanyaggal (Paramithotis és Ratcliffe, 1996). Ide olyan rövid életű, közvetlenül a bursából emigráló, posztmitotikus sejteket soroltak, amelyek a perifériás B lymphocytáknak mintegy 60%-át alkotják (Paramithotis és Ratcliffe, 1993). Az LT2 antigén bursai expressziós mintázata is alátámasztja azt a hipotézist, miszerint az emigráló sejtek közvetlenül a folliculusok kéregállományából lépnek ki (Sayegh és mtsai, 2000). Az antigén további karakterizációra (molekula tömege, természete) még nem került.

szialil Lewis^X / Lewis^X (CD15)

A szialil Lewis^X (szializált-fukozilált-laktózin) a szelektinek egy természetesen előforduló ligandja (Varki, 1994), amely jelen van a bursát kolonizáló myeloid és lymphoid prekursorok sejt felszínén. Kísérletesen igazolták, hogy a szialil Lewis^X epitóp nélkülözhetetlen a B sejt prekursorok bursába történő migrációjához, a sejtek „homingjához” (Masteller és mtsai, 1995a). Az embrionális fejlődés 15-17 napja között, a bursai B sejteken

egy glikozilációs fenotípus váltás következik be: a szialil Lewis^X expressziója egyre csökken és helyette megjelenik a Lewis^X molekula. Ez az expressziós mintázat változás csakis a bursai mikrokörnyezetben figyelhető meg és szoros korrelációt mutat a B sejtekben lezajló génkonverziós eseménnyel (Masteller és mtsai, 1995b). A kikelés körüli időszakban, a B sejtek Lewis^X expressziója mérséklődik az embrionálisan jelenlévőhöz képest. Ez a második váltás elképzelhető, hogy összefüggésben van a sejtek bursából való emigrációjával (Masteller és mtsai, 1995b). A Lewis^X megjelenése és a szialil Lewis^X elvesztése egy olyan érési folyamat része, amely során a B sejtek elveszítik képességüket a bursába történő belépésükhöz (Masteller és mtsai, 1995a).

chL12 / Ov antigén

Az chL12 (más néven Ov antigén) egy alloantigén, amelyet a H.B19+ csirke törzs sejtjei hordoznak. Ezt a 38-40 kDa tömegű molekulát a 11A9 monoklonális ellenanyag (IgM izotípusú) ismeri fel. Eredetileg T lymphocytákon expresszálódó molekulaként írták le, amely igen korán az embrionális fejlődés 3. napjától detektálható a szikhólyag vérszigeteiben és intraembrionálisan a legtöbb hemopoietikus sejt is hordozza a felszínén (kivételt képezve az erythroid sejtvonallal). Ezen kívül, 14 napos embrió bursájában valamennyi Bu-1 pozitív B sejt, egyben a chL12 pozitivitást is mutat, ellenben a felnőtt állatok bursai folliculusaiban csak igen kevés chL12 pozitív sejt mutatható ki (Houssaint és mtsai, 1991). Néhány évvel később megjelent publikációkban a chL12 antigén expresszióját a bursális B lymphocyták szelektív túlélésével hozták összefüggésbe (Lampisuo és mtsai, 1998). Ezt egy előzetes megfigyelés alapozta meg, miszerint az újonnan bursából emigráló B sejtek magas szinten expresszálják az chL12 antigént és az MHCII molekulát (Paramithiotis és Ratcliffe, 1993).

csirke CD5

A csirke CD5 molekulája egy 64 kDa-os foszforilált glikoprotein, amely valamennyi T és B lymphocytá sejt felszínén jelen van (Koskinen és mtsai, 1998), ellentétben a humánnal és az egérrel, ahol a T sejtek mellett a B sejteknek csak egy szubpopulációja (B-1a) expresszálja. Kifejeződésének mértéke eltérő: a perifériás $\alpha\beta$ T sejtek magas szinten expresszálják, ellenben $\gamma\delta$ T sejtek és B sejtek csak kisebb mértékben fejezik ki. Az emlősökhöz hasonlóan, csirkében is megfigyelték, hogy a T sejteken a CD5 expressziós mértéke aktivitás függő módon változik, így feltételezik a funkcionális megegyezést is. Emlősökben a CD5 glikoprotein a T és B sejt receptorok által közvetített jelátviteli folyamatok negatív regulátor molekulájaként működik (Tarakhovsky és mtsai, 1995; Bikah és mtsai, 1996). Ezen kívül fontos szerepet

játszik a thymocyták pozitív szelekciójában, illetve az érett T sejtek TCR receptorának antigén iránti affinitás szabályozásában (Azzam és mtsai, 2001). Csirkében a CD5 expressziója a T és B sejt prekursorokon, már a primer nyirokszervekbe történő migrációjuk előtt megfigyelhető.

csirke CD80 (chCD80)

35 kDa-os glikoprotein, amely az emlősökhöz hasonlóan a bél és a lép dendritikus sejtjein, monocyta/macrophag sejteken és B sejteken expresszálódik. Csirkében CD80 pozitívítást a bursai folliculusok kéregállományában is sikerült kimutatni, de ezeket a sejteket monocytákként írták le (Lee és mtsai, 2011). Funkcióját tekintve, kostimulációs molekulaként vesz részt a T sejtek felszínén expresszálódó CD28-al kapcsolódva, elősegítve a naív T sejtek teljes aktivációját (Lenschow és mtsai, 1996), ellenben CTLA4-vel (CD152) interakcióba lépve gátolja a T sejtek proliferációját és IL-2 termelését (Krummel és Allison, 1996).

csirke CD1

A csirke CD1 sejt felszíni protein funkciója megegyezik az emlősökben leírtakkal, miszerint lipideket és glikolipideket prezentál T sejtek számára. Működése nagyon hasonlít az MHC rendszerhez ezért is feltételezik, hogy a CD1 molekula a klasszikus MHCI-ből alakult ki a korai tetrapódákban (Dascher, 2007). Csirkében az emlősökkel gyakorlatilag azonos sejt típusok expresszálják, így elsősorban a B lymphocyták (bursális és perifériás is), thymus medullájában lokalizálódó dendritikus sejtek, valamint a bőr Langerhans sejtjei. Emlősökben a thymus kortikális sejtjei is kifejezik a CD1 molekulát, ezt azonban csirkében nem sikerült alátámasztani. Humánban a CD1 proteinek öt izoformája ismert (CD1a-e), ezek expressziója különböző az egyes szövetekben. Csirkében eddig két izoformát különítették el (CD1-1 és CD1-2), ezek közül a CD1-1 került karakterizálásra (Ly és mtsai, 2010).

CB11

A CB11 IgM izotípusú monoklonális antitestet, csirkében a B lymphocyták differenciációjának nyomon követésére alkalmas marként írták le. Felnőtt csirkében a bursális B lymphocyták egy szubpopulációját jelöli, amelynek sejtjei elszórtan a bursai folliculusok kortiko-medulláris határánál, a kéregállomány felőli oldalon lokalizálódnak. A medulla CB11-pozitív sejteket nem tartalmaz. Perifériásan a keringésben lévő valamennyi B lymphocyta festődik az antitest által, de a lép B dependens csíracentrumai és periellipszoidális régiói nem jelölődnek. A lép periarteriális lymphoid hüvelyében a

T lymphocyták mintegy 3%-a mutat CB11 pozitivitást. Thymusban a kis lymphocyták körülbelül 12%-a, valamint a monocyták is festődnek a CB11 antitesttel. Embriionális megjelenését tekintve, a fejlődés 12. napjától kezdve a bursai folliculusokat kitöltő valamennyi B lymphocyta expresszálja a CB11 antigént. A kikelés előtt a CB11 antigén expressziójának egy drasztikus lecsengése figyelhető meg, amely egy kis szubpopulációra korlátozódik. Ez a szubpopuláció felnőtt korban is stabilan megfigyelhető. A CB11 antitest által felismert molekula 37 kDa tömegű (Olson és Ewert, 1990). Az antigén valós funkciójára és természetére a jelenlegi szakirodalomban még nincs adat.

Hy86b5

A Hy86b5 IgG1 izotípusú monoklonális ellenanyag a felnőtt csirke bursai B lymphocytáinak egy szubpopulációját jelöli, amelynek sejtjes alkotói a kortiko-medulláris határ mentén a kéregállományban, valamint az interfollikuláris régióban figyelhetők meg. Továbbá a thymus sejtjeinek több mint 90%-át is jelöli, habár a kortikális sejteket alacsonyabb intenzitással festi. A lépben erősen festődő sejteket azonosították a T dependens periarteriális lymphoid hüvely területén, illetve gyengébb festési intenzitással a B dependens periellipszoidális régió is jelölődik. Az embriionális fejlődés során valamennyi bursális B lymphocyta expresszálja a Hy86b5 által felismert molekulát, amelynek a CB11 antigénhez hasonlóan még a kikelés előtt egy drasztikus expressziós lecsengése figyelhető meg a kortikális B sejt szubpopulációra leszűkülve. A Hy86b5 antitest egy 142 kDa-os és egy 162 kDa-os, feltehetőleg heterodimert képező molekulákat jelöl (Olson és Ewert, 1990). Az antigén funkciójáról a jelenlegi szakirodalomban nincs adat.

Célkitűzések

Az immunológiai kutatások gyakran használt modell állatait a madarak. Laboratóriumunkban számos olyan madár specifikus ellenanyag készült, amelyek a lymphomyeloid szervek különböző sejtípusait jelölik. Munkám során ezek közül, egy gyöngytyúk lymphocytáira specifikus 7H3 elnevezésű, egér monoklonális ellenanyag immuncitokémiai és biokémiai karakterizálását végeztem. A 7H3 antitest festési mintázata a felnőtt gyöngytyúk bursa Fabricii-ben különbözik az eddig ismert összes markertől, mivel csak a kortikális B lymphocyták egy csoportját jelöli.

Célkitűzéseim a következők voltak:

1. A 7H3-pozitív sejtek szöveti eloszlásának vizsgálata a felnőtt gyöngytyúk szöveteiben
2. A 7H3-pozitív sejtek megjelenésének vizsgálata az embrionális fejlődés során
3. A 7H3 ellenanyag által jelölt antigén sejten belüli lokalizációjának a meghatározása
4. A 7H3 antigén molekulatömegének meghatározása

Anyagok és módszerek

1. Kísérleti állatok

A vizsgálatokhoz különböző korú gyöngytyúk (*Numida meleagris*) embriók, illetve kikelt állatok szerveit használtuk fel. A tenyész tojásokat kistermelőtől (Katona Lajos, K+K farm Kft.) vásároltuk és laboratóriumunk saját keltetőgépében forgatórácson inkubáltuk 38°C-on, 90%-os páratartalom mellett. A kikelt állatokat néhány napig inkubátorban (37°C-on) tartottuk, majd a SOTE Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézetének állatházába kerültek át. Az állatok tartási körülményei megfeleltek az állatok védelméről szóló 1998. évi XXVIII. törvény II. fejezet 4. és 5.§ előirtaknak.

Az állatkísérletek a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottságának jóváhagyásával történtek (engedélyszám: 779-000-2005).

2. A minták szövettani feldolgozása

A kísérletek során embrionális és felnőtt állatok nyirokszerveit (thymus, bursa Fabricii, lép, coecalis tonsilla) használtuk fel, kontroll céljából további szövetmintákat (máj, tüdő, vese, agy) is megvizsgáltunk. Az embrionális szervek eltávolítását és az utópreparációs munkálatokat sztereomikroszkóp alatt, mikropreparációra alkalmas eszközökkel (mikroolló, csipesz, rovartűk, embrióspatula) végeztük. A kivett szervekből immuncitokémiai és immunfluoreszcens vizsgálatokra zselatinos fagyasztott- vagy májba ágyazott blokkokat („májjas blokk”) készítettünk.

2.1. Zselatin-szacharózos fagyasztott blokk készítése

A kivett szerveket 1 órán keresztül fixáltuk pufferezt 4%-os paraformaldehidben (PFA), majd foszfáttal pufferezt sóoldatban (PBS; pH 7,2) háromszor 5 percig mostuk. A szerveket a fixálást követően, egy éjszakát 15%-os szacharóz PBS oldatában 4°C-on tartottuk. A beágyazást megelőzően 37°C-on 1 órán keresztül 15% szacharózt (Reanal puris, M:342,30) és 7,5% zselatint (Fluka, 04055) tartalmazó PBS-ben inkubáltuk. Az így impregnált szerveket előre, tálkákba kiöntött zselatinágyra helyeztük, néhány percig vártunk, hogy a zselatin ágyhoz tapadjanak. Ezután meleg zselatinnal teljesen befedtük őket és 4°C-on 3 percig szilárdulni hagytuk. A kívánt méretű zselatinos blokkokat körbevágással alakítottuk ki és Shandon Cryomatrix-szal (Anatomical Pathology Ind., 67690006) feliratozott kartonpapírra

rögzítettük. Végül folyékony nitrogénnel -60°C -ra lehűtött izopentánban (2-metilbután; Sigma-Aldrich, M32631) lefagyasztottuk, felhasználásig -80°C -on tároltuk.

2.2. Májba ágyazott fagyasztott blokk készítése

A szerveket PBS-ben tartottuk a blokk elkészítéséig. A beágyazás során $1,5 \times 1,5$ cm-es kartonlapra egy májszeletet helyeztünk el köralakban, majd a beágyazni kívánt szervekkel (lehetőleg hézagmentesen) töltöttük ki a belsejét, a legvégén az egészet lefedtük, egy újabb májszelet segítségével, ezzel megelőzve a szervek kiszáradását. Az így elkészített blokkot folyékony nitrogénben -193°C -on lefagyasztottuk és felhasználásáig -80°C -on tároltuk.

2.3. Beágyazáshoz használt oldatok

1 liter PBS összetétele: 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,42 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g KH_2PO_4 ; desztillált víz.

A szacharóz tartalmú PBS puffer: 15 mg D-szacharózt oldottuk fel 100 ml PBS-ben, majd az oldatot 4°C -on hűtőben tároltuk, a szacharózt (15 m/V%) és zselatint (7,5 m/V%) tartalmazó PBS puffert pedig -20°C -on fagyasztva tároltuk.

Pufferelt 4%-os paraformaldehid (PFA, pH=7,4): 700 ml desztillált vizet lombikban 60°C -ra melegítettük fel. 40 g paraformaldehydet adtunk hozzá és mágneses keverőre helyeztük. A keletkezett csapadékot cseppenként hozzáadott 20%-os (0,5 M) NaOH-dal oldottuk fel. Az oldatot megszűrtük, majd 250 ml 0,24 M PBS-t adtunk hozzá. Még mindig mágneses keverőn beállítottuk a pH-t, majd az oldatot átöntve 1000 ml-es mérőhengerbe, a térfogatát desztillált vízzel kiegészítettük 1000 ml-re. Végül 15 ml-es csövekbe kiöntve -20°C -on tároltuk.

3. Metszetek készítése

A metszésre Shandon gyártmányú kriótómot használtunk. A zselatinos blokkokat -24°C -os, a „májás blokkokat” -19°C -os munkahőmérsékleten metsztük. A metszés előtt a blokkokat a kriosztátba helyeztük, hogy felvegyék annak hőmérsékletét. A mintákból 8-12 μm vastag metszeteket készítettünk, amelyet poly-L-lysine-nel (Sigma, P8920) bevont tárgylemezre vettünk fel. A májas blokkból készült metszeteket szobahőmérsékleten a lemezekre rászárítottuk és utólagosan 10 percig, acetonban (Sigma-Aldrich, 32201) fixáltuk. Felhasználásukig -20°C -on tékába rendezve tároltuk.

4. Vérkenet készítés

A madarak szárnyának felszíni vénájából fecskendő segítségével vért vettünk, amelybe előzetesen heparint szívtunk fel (1ml vérhez 0.1 ml heparin). A frissen levett vérből 1 cseppet helyeztünk a tárgylemezre, majd egy másik tárgylemez segítségével húztuk szét a felületén. Az így elkészült keneteket szobahőmérsékleten állni hagytuk, majd száradás után 10 percig metanolban (Sigma-Aldrich, 32213) fixáltuk. Felhasználásig tékába rendezve -20°C -on tároltuk.

5. Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia

Az immunhisztokémiai és immunfluoreszcens vizsgálatokat fagyasztott metszeteken végeztük.

5.1. Immunhisztokémia

A metszeteket PBS-ben 10 percig, szobahőmérsékleten rehidratáltuk (a zselatinos metszeteket először a zselatin kioldása érdekében, néhány percre előre felmelegített PBS-be helyeztük, majd szobahőmérsékletű PBS-be átrakva rehidratáltuk őket). Ezt követően ráértük a metszetekre a primer ellenanyagot [2. táblázat] ($50-80\ \mu\text{l}/\text{metszet}$), ami vagy egy monoklonális ellenanyagot tartalmazó, hígítatlan sejttenyészet felülúszója vagy előzetesen betitrált hígítású ellenanyagoldat volt. A szükséges hígításokat 1%-os BSA-t tartalmazó PBS-ben (PBS-BSA) végeztük. A primer ellenanyaggal lefedett metszeteket 45 percig, szobahőmérsékleten, nedves kamrában inkubáltuk, amelyet mosás követett PBS-ben (3×5 perc). Ezután PBS-BSA-ban kihígított, biotinilált szekunder ellenanyagot (3. táblázat) vittünk fel a metszetekre, amellyel további 45 percig inkubáltunk (szobahőmérsékleten és nedves kamrában). Újabb mosás PBS-ben (3×5 perc). A szöveti endogén peroxidázok aktivitásának blokkolása érdekében a metszeteket PBS-el 3%-ra hígított H_2O_2 -ba (Sigma-Aldrich, H1009) helyeztük 10 percre. A háromszori PBS mosás után avidin-biotin-peroxidáz komplexet (ABC; Vectaststain Elite PK-6100; Vector Laboratories) pipettáztunk a metszetekre és fél órát inkubáltuk így őket. Az ABC-t a cég által megadott arányban PBS-ben hígítottuk ki. Először az avidin oldatot mértük bele a PBS-be, majd ehhez megfelelő mennyiségben adtunk a biotinilált peroxidázt tartalmazó oldatból, alaposan felkevertük és fél óra állás után használtuk fel. Mosás (PBS-ben 3×5 perc) után a kötődött peroxidáz enzim aktivitását kloronaftollal detektáltuk (Sigma, C8890). Előzetesen a kloronaftolt előre elkészített törzsoldatából hígítottuk ki PBS-ben ($100\ \mu\text{l}$ kloronaftol törzsoldat $100\ \text{ml}$ PBS-ben oldva), amelyet sötétben mágneses keverőn legalább fél órát kevertettünk. Felhasználás előtt szűrőpapíron átszűrtük és 3%-os H_2O_2 -ot ($500\ \mu\text{l}$) adtunk hozzá. A metszeteket ebben az oldatban 30 percig sötétben

inkubáltuk. Az utolsó mosást (PBS-ben 3x5 perc) követően a metszeteket vízdékony lefedőanyaggal (Poly-Aqua Polyscience Inc., Warrington PA, USA; 18606) fedtük le és 4°C-on hűtőben tároltuk.

5.2. Immunfluoreszcencia

5.2.1. Egyszeres immunfluoreszcens festés

A metszetek előkészítését, primer ellenanyaggal való inkubálását az immunhisztokémiai fejezetben leírtakkal azonos módon végeztük. Ezután kihígított szekunder ellenanyagot (50-80 µl/metszet) mértünk a metszetekre. Ez lehetett közvetlenül fluorokrómmal konjugált (4. táblázat) vagy csak biotinilált antitest. Az inkubálást 45 percig, szobahőmérsékleten, fénytől védetten, nedves kamrában végeztük. A biotinilált szekunder ellenanyagok bekötődésének detektálására streptavidinnel kapcsolt fluorokrómot (Invotrogen; Streptavidin, Alexa-Fluor 594 kat. szám: S32356 és Streptavidin, Alexa-Fluor 488 kat. szám: S32354) alkalmaztunk, amely ismételt 45 perces, fénytől védett inkubálást igényelt. Az inkubálások között és után PBS-sel mostuk a metszeteket 3x5 percig. A sejtmagok kimutatására DAPI-t (4,6 diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride; Invitrogen, D1306) használtunk, PBS-ben hígítva 1µg/ml arányban, 15 perces inkubálási idővel. Az utolsó mosást követően a metszeteket lefedtük és sötétben 4°C-on tároltuk.

5.2.2. Kettős immunfluoreszcens festés

Annak érdekében, hogy a 7H3 antitest által jelölt molekula expresszióját egyéb antigénekkkel is összehasonlítsuk, kettős immunfluoreszcens festéseket végeztünk.

A kettős festés során első lépésben a metszetekre ráértük az első primer ellenanyagot, amelyet a fentiekben említett körülményekkel azonos módon 45 percig inkubáltuk. A mosást követően (PBS-ben 3x5 perc) közvetlenül fluorokrómmal kapcsolt szekunder ellenanyagot vittünk fel a metszetre (4. táblázat), amely a primer ellenanyagok megfelelő faj és/vagy izotípus specifikus volt. A munkafolyamat további lépéseit fénytől védetten végeztük. 45 perces, nedves kamrában történő inkubálás után PBS-ben mostuk (3x5 perc). Ezután vittük fel a második primer ellenanyagot, amellyel újból 45 percig inkubáltunk és a végén PBS-ben (3x5 perc) mostuk. A második szekunder ellenanyagot úgy választottuk meg, hogy annak fluoreszcenciája eltérjen az előzőleg használt szekunder ellenanyagétól. A metszetekre való pipettázását 45 perces inkubáció követte. A sejtmagok kimutatására DAPI-t használtunk, amit 15 percig hagytuk a lemezeken. A mosás után (PBS-ben) a metszeteket vízdékony fedőanyaggal fedtük le, majd hűtőben 4°C-on tároltuk.

5.3. Az immunfestés során alkalmazott primer és szekunder ellenanyagok, előhívószerek, oldatok

5.3.1. Primer ellenanyagok

2. táblázat: Primer antitestek

Primer antitest	Izotípus	Antigén specificitás	Felismert sejtípusok	Beszerezés forrása/ Forgalmazó
QH1	IgG1	α -makroglobulin	Minden hemopoiitikus és endothel sejt, kivéve erythrocyták (fűj és gyöngytyúk)	DSHB
K55	IgG1	97 és 42 kDa-os sejt felszíni proteinek	pán leukocyta marker	Hyun S. Lillehoj (USA) szívességéből
EIV-E12	IgG1	205 kDa-os sejt felszíni molekula	Minden B lymphocyt, plazma sejt, és a bursai szekréción dendritikus sejt prekurzorok	Todd Pharr (USA) szívességéből
LT2	IgG1	Ismeretlen	A bursai folliculusok kortikális B –sejtjeinek egy része, és a perifériás B-sejtek 60%-a	Michael J.H.Ratcliffe (Canada) szívességéből
BoA1	IgG1	Bu-1a + Bu-1b	B-sejtek (kivéve a plazma sejtek) és a macrophagok egy alcsoportja	Saját laboratóriumunkban kifejlesztve (Igyártó és mtsai, 2008)
GTr1	IgG1	Ismeretlen	thrombocyt	Saját laboratóriumunkban kifejlesztve (Bódi és mtsai, 2009)
N1C2	IgG1	30 kDa protein	Madár dendritikus sejtek	Saját laboratóriumunkban kifejlesztve (Nagy és mtsai, 2001)
Polyclonal rabbit anti-CD3	Poliklonális nyúl	Humán-CD3	Minden humán T sejt. Keresztreakál csirkével és gyöngytyúkkal	Dako
Ser10	Poliklonális nyúl	Phospho-Histon H3	G2 fázisban lévő sejtek	Cell Signaling

A 2. táblázat tartalmazza a klón nevét, az ellenanyag izotípusát, a felismert molekulát, milyen sejtek detektálását teszi lehetővé és a beszerzés forrását.

5.3.2. Szekunder ellenanyagok

3. táblázat: Szekunder ellenanyagok

Megnevezés	Forrás	Katalógus szám
lóban készült biotinilált anti-egér IgG (H+L)	Vector Laboratories	BA-2000
kecskében készült biotinilált anti-nyúl IgG (H+L)	Vector Laboratories	BA-1000
kecskében készült biotinilált anti-egér IgM (μ lánc)	Vector Laboratories	BA-2020
kecskében készült peroxidáz kapcsolt anti-egér IgG	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-2005

A 3. táblázat tartalmazza a biotinilált és peroxidáz kapcsolt szekunder ellenanyagok nevét, forrását és katalógus számát. Hígításukat 1:200 PBS-BSA-ban végeztük.

4. táblázat: Fluorokrómmal kapcsolt szekunder ellenanyagok

szekunder antitest	fluorokrómok excitációs hullámhossza	
	488	594
anti-egér IgG (H+L)	A-11001	A-11005
anti-egér IgG1 (γ 1)	A-21121	A-21125
anti-egér IgG2b (γ 2b)	A-21141	A-21145
anti-egér IgM (μ lánc)	A-21042	A-21044
anti-nyúl IgG (H+L)	A-11008	A-11012

A 4. táblázatban szereplő fluorokrómmal konjugált szekunder antitesteket az Invitrogen-től (Life Technologies) rendeltük. Az antitestek kecskében készültek. A cellák tartalmazzák a faj és izotípus specifitást, a fluoreszcencia csúcsintenzitást és a katalógus számot. Hígításukat 1:100 PBS-ben végeztük.

5.3.3. Felhasznált oldatok, előhívószerek

Kloronaftol készítése: törzsoldat készítéséhez 500 mg 4-chloro-1-naphtolt (Sigma, C8890) oldunk fel 2 ml abszolút etanolban (Molar Chemicals Kft, 02910-101-340) majd -20°C -on tároljuk. Előhíváskor a törzsoldatból hígítunk, hogy a végtérfogat 25 mg/100 ml PBS legyen.

1%-os PBS-BSA: 1 g BSA-t (Bovine Serum Albumin; Sigma, A9647), 100 ml PBS-ben feloldunk. Szűrés után 0,1 %-ban NaN_3 -at adunk hozzá.

6. Metszetek értékelése, fényképezése, képfeldolgozás

A metszeteket Zeiss Axiophot mikroszkóppal tekintettük át, és a hozzá csatlakoztatott Zeiss AxioCam HCR kamera segítségével digitális képeket készítettünk különböző

nagyításokon. A képek további feldolgozását, szerkesztését Adobe Photoshop 7.01 típusú programmal végeztük.

7. Gélelektroforézis és Western-blot

7.1. Minta

A 7H3 monoklonális ellenanyag által jelölt sejtfelszíni antigén molekulatömegét gélelektroforézis és Western-blot segítségével határoztuk meg. Felnőtt állatok thymus lebenyeiből nyert sejteket lizáló pufferrel kezeltük és az így kapott lizátumot vizsgáltuk tovább SDS-PAGE technikával.

7.1.1. Thymus lizátum készítés

Első lépésben thymocytá szuszpenziót készítettünk. A kivett, környező szövetektől megtisztított thymus lebenyek tömegét lemértük, majd óraüvegre helyeztük, PBS-el átnedvesített lencse papírra raktuk és olló segítségével apró darabokra vágtuk. Ezután a szerv darabokat a lencse papírba csomagoltuk, kevés PBS hozzáadása után görbült csipesszel óvatosan nyomkodtuk a papír felszínét (a papír pórus mérete csak a lymphocytákat engedi át). A lencse papíron átszűrődő sejt szuszpenziót 15 ml-es centrifuga csőbe gyűjtöttük, majd 4°C-on 520 g-vel 25 percig centrifugáltuk. A kiülepedett sejtekhez lízis puffert mértünk (előzetesen lemért 1 g szövethez 1 ml lízis puffert). Jégen egy órát állni hagytuk, közben néhányszor alaposan felkevertük. A legvégén 10 percig, 4°C-on 21000 g-vel centrifugáltuk, a keletkezett felülúszót tiszta centrifuga csőbe mértük át és felhasználásig -20°C-on tároltuk.

7.1.2. A minta előkészítése a blottoláshoz

Egy tiszta 1,5 ml-es centrifuga csőbe 1:1 arányban mértük össze a mintát és a redukáló puffert. Az elegyet 4 percre forrásban lévő vízbe helyeztük, végül a mintákat a géltre rétegeztük.

7.2. Gélek összemérése

A gélöntés Bio-Rad gélöntővel történt és a folyamatot vízszintező asztalon végeztük. A két üveglapot (gyárilag távtartóval ellátott) gélkazettába fogtuk be (ügyelve arra, hogy a két üveglap alsó élei egy síkban legyenek), majd a gélkazettát az alján gumicsíkkal ellátott gélöntő állványra helyeztük. Ezután kezdtük meg az alsó gél összemérését.

Alsó gél vagy szeparáló gél

Az alsó gél komponenseit (5. táblázat) folyamatos enyhe keverés mellett összemértük, ügyelve a buborék képződésére. Az ammónium perszulfátot (APS) és a tetrametil-etiléndiamint (TEMED; Bio-Rad, 161-0801) ebben a sorrendben, a legvégén adtuk az elegyhez. Ezt követően a gél (kb 4 ml) pipettával a két üveglap közé engedték (ügyelve arra, hogy buborékmentes maradjon a rendszer), majd a gél tetejére vizes amilalkoholt (kb 0,5-1 ml) rétegeztünk a felület kiegyenlítésének céljából. 45 perc polimerizációs idő után az amilalkoholt leöntöttük és a gél tetejét háromszor átmostuk ultratiszta vízzel (UTV).

ALSÓ GÉL	12 %
ultratiszta víz (UTV)	5,22 ml
1,5M Tris-HCl, pH 8,8	3 ml
10% (w/v) SDS-oldat	120 µl
40% Akrilamid/Bis oldat	3,6 ml
10% ammónium-perszulfát (APS)	60 µl
tetrametil-etilén-diamin (TEMED)	6 µl

5. táblázat: Alsó gél összetétele. A végtérfogat 12 ml.

Felső gél vagy koncentráló gél

A felső gél összetevőit (6. táblázat) ugyanúgy mértük össze, mint az előző esetben. A gél öntése előtt a fésűt ferdén behelyeztük a két üveglap közé, majd az összemért gélből körülbelül 1 ml-t lassan rápipettáztunk a polimerizálódott alsó gél tetejére. Végül a fésűt a helyére állítottuk ügyelve arra, hogy a fogai alatt ne maradjon buborék. A gél szobahőmérsékleten 45 percig hagytuk polimerizálódni.

FELSŐ GÉL	40 %
ultratiszta víz (UTV)	6,425 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml
10% (W/V) SDS-oldat	100 µl
40% Akrilamid/Bis oldat	0,975 ml
10% ammonium perszulfát (APS)	50 µl
tetrametil-etilén-diamin (TEMED)	10 µl

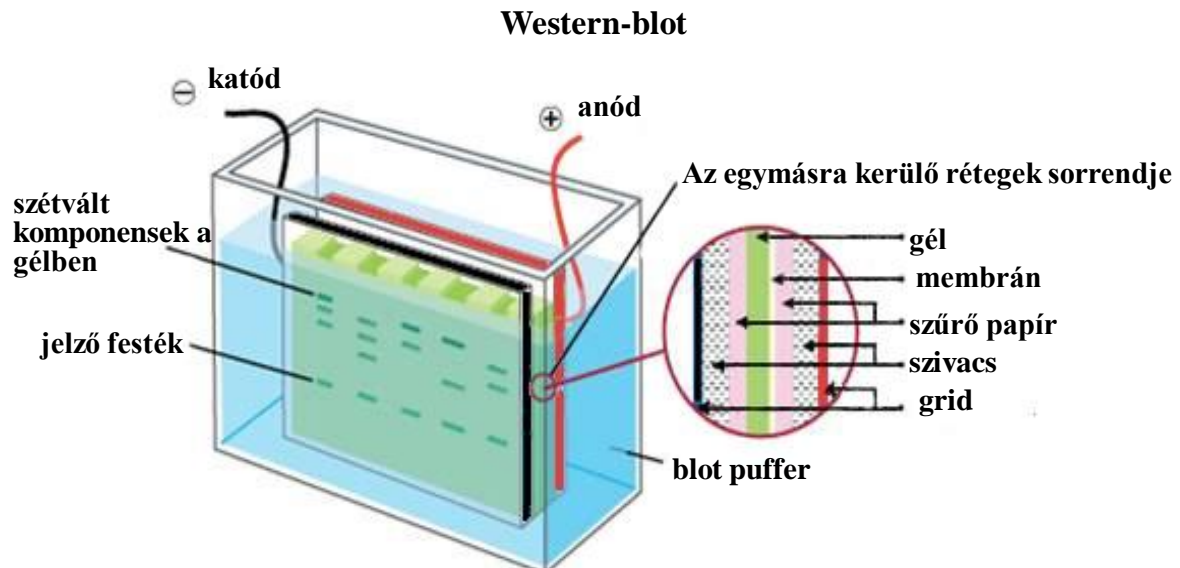
6. táblázat: Felső gél összetétele. A végtérfogata 10ml.

7.3. SDS gélelektroforézis, futtatás

A polimerizációs idő lejárta után az üveglapokat belepattintottuk az elektród tartóba és ezt a szerkezetet a futtató kádba helyeztük. Futtató pufferrel feltöltöttük a két gél közötti, belső kamrát (úgy, hogy a folyadék szintje ellepje a zsebeket), a maradékot a kazettákon kívülre öntöttük. Ezután a mintákat (15-20 μl /zseb) a kialakított zsebekbe mértük Hamilton fecskendő segítségével (a molekulásúly standardból 5 μl -t vittünk fel az első zsebbe). Majd a futtatás szobahőmérsékleten, 200 Volt-on 50 percig tartott.

7.4. Blottolás nitrocellulóz membránra

A futtatást követően a gélt tálkába kiöntött blottoló pufferbe helyeztük. A blottoláshoz a következőket megfelelő sorrendben összeraktuk (4. kép): szűrőszivacs, 2 db szűrőpapír, gél, nitrocellulóz membrán, 2 db szűrőpapír, szűrőszivacs (előzetesen minden elemet blottoló pufferbe áztattuk). Ezeket összezártuk, a blottoló edénybe helyeztük, majd a kádat blottoló pufferrel feltöltöttük. A kádba egy jégakkut és egy keverőbabát is elhelyeztünk, a túlmelegedés ellen és az egyenletes hőmérséklet fenntartása érdekében. 100 Volt-on, 60 percig blottoltunk. Ezután a membránt 5%-os tejporos oldatban blokkoltuk 1 éjszakán keresztül 4°C-on hűtőben.



4. kép: A Western-blot sematikus felépítése. A kép a blottoláskor egymásra kerülő rétegek sorrendjét és a kazetta pufferrel feltöltött kádban történő elhelyezését mutatja. Forrás: http://www.leinco.com/general_wb (2011-05-07).

7.5. Festés

A membránt az 5%-os tejpor oldatból kivéve PBS-Tweenben mostuk (3x5 perc), majd a zsebeknek megfelelően, szikével csíkokra vágtuk. Ezeket parafilmmel kibélelt tálkákba helyeztük, majd ráértük a primer ellenanyagot (600 µl/membrán csík), amelyet előzetesen 3%-os tejpor tartalmú PBS-Tweenben hígítottunk ki. 45 perces inkubációs idő leteltével a membránokat mostuk PBS-Tweenben (3x5 perc). Szekunder ellenanyagként biotinilált vagy tormaperoxidázzal kapcsolt ellenanyagokat (3. táblázat) használtunk. Mindkét esetben 3%-os tejpor tartalmú PBS-Tweenben végeztük a hígítást és 45 percig szobahőmérsékleten hagytuk a membrán csíkokon. A mosást követően (PBS-Tweenben 3x5 perc), a biotinilált szekunder ellenanyag alkalmazásakor további ABC-vel történő inkubálást végeztünk 1 órán keresztül. Az ABC-t a felhasználása előtt legalább fél órával hamarabb kihígítottuk (PBS-Tweenben 1:100), majd közvetlenül a membránra tétel előtt tovább hígítottuk PBS-Tweennel, úgy hogy 1:300-as végkoncentrációt kapjunk. Az 1 óra elteltével mostuk (PBS-Tweenben 3x5 perc) majd megkezdtük az előhívást, amit Novared Peroxidase Substrate Kit-el (Vector Laboratory, SK-4800) végeztünk. Ezt a cég által megadott recept alapján 5 ml UTV-be mértük össze. A színreakció kifejeződéséhez 20 perc kellett, majd a felesleges kromogént mosással távolítottuk el (PBS-Tweenben 3x5 perc és PBS-ben 1x5 perc). A membránokat kiszárítva tároltuk.

7.6. A lizátum készítéséhez és a western-blotthoz használt oldatok, előhívószerek

Lízis puffer: 150 mM NaCl; 50 mM Tris pH 7,5; 1% TritonX 100; 0,1% SDS; proteáz inhibitor.

Vizes amilalkohol: 50 ml amilalkohol (Reanal, 01136) 5 ml UTV-ben oldva (szobahőmérsékleten tároljuk).

5x futtató puffer: 9 g Tris; 43,2 g glicin (Sigma, G8898); 3 g SDS (Bio-Rad, # 1610302); 600 ml UTV (4°C-on tároljuk).

10x blot puffer: 30,3 g Tris (Bio-Rad, 161-0719); 144 g glicin; 800 ml UTV; 200 ml metanol (4°C-on tároljuk).

PBS-Tween: 200 ml 10xPBS; 1800 ml UTV; 1 ml Tween 20 (Reanal, 20142) (szobahőmérsékleten tároljuk).

Redukáló puffer: 4 ml UTV; 1 ml 0,5 M Tris puffer (pH 6,8); 0,8 ml glicerin; 1,6 ml 10% SDS 0,4 ml merkamptoethanol; brómfenolkék (-20°C-on tároljuk).

10% -os ammónium perszulfát $/(NH_4)_2 S_2O_8/$: 100 mg APS (Bio-Rad, 161-0700) 1 ml UTV-ben oldva.

5%-os tejpor (blokkoló) oldat: 5 g tejpor 100 ml PBS-Tweenben oldva.

Eredmények

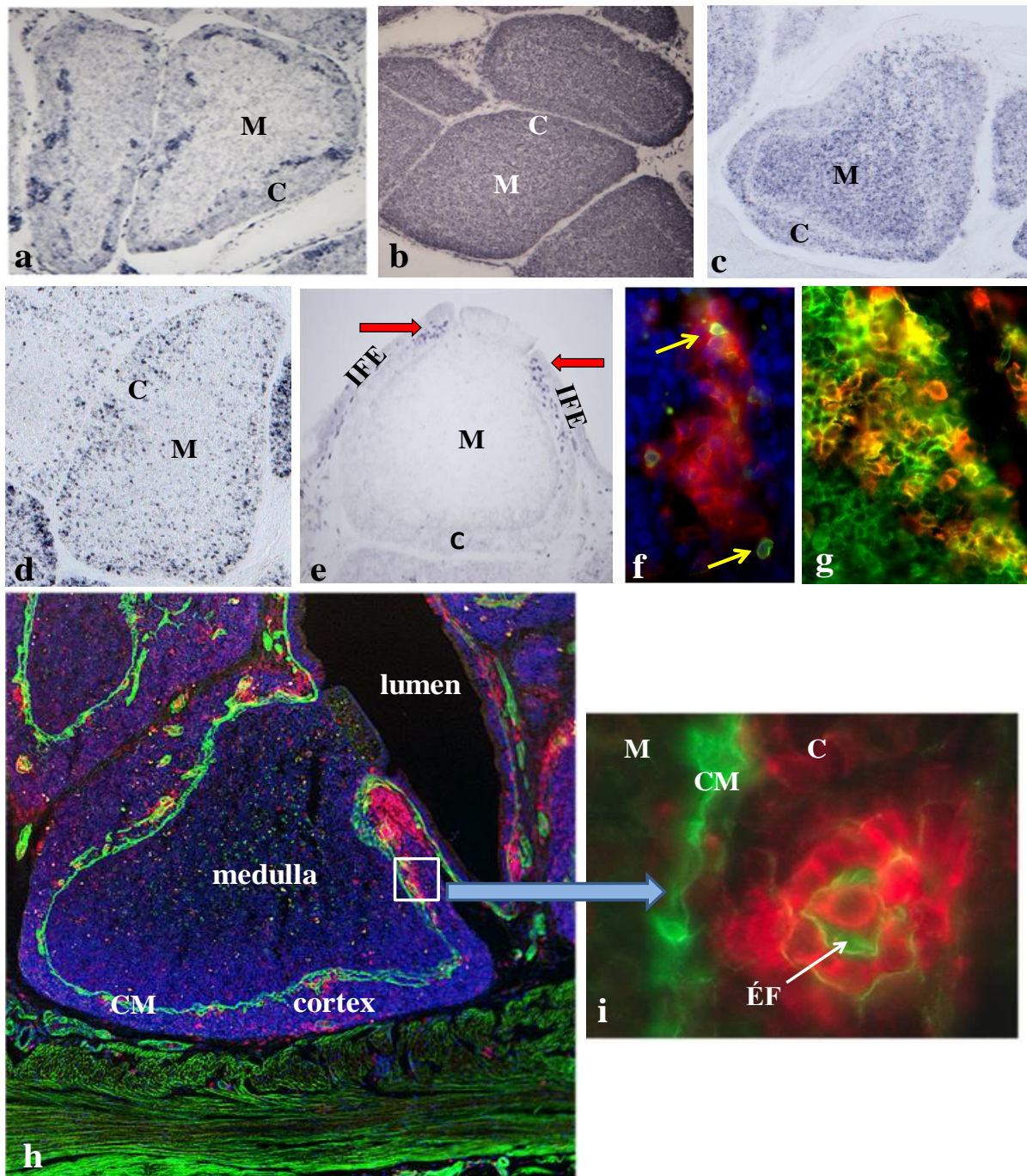
1. A 7H3 ellenanyaggal jelölt sejtek eloszlásának meghatározása kifejlett gyöngytyúk primer nyirokszerveiben (bursa Fabricii, thymus)

A 7H3 monoklonális ellenanyag (izotípusa IgG2b) által felismert molekula kifejeződését először felnőtt gyöngytyúk nyirokszerveiben vizsgáltuk. A 10 hetes állat bursa Fabricii folliculusainak kéregállományában a 7H3 ellenanyag elszórtan elhelyezkedő, kerekded morfológiájú sejtekből álló, elkülönült sejtcsoportokat jelölt. A velőállomány sejtjei nem festődtek az ellenanyaggal (5/a kép).

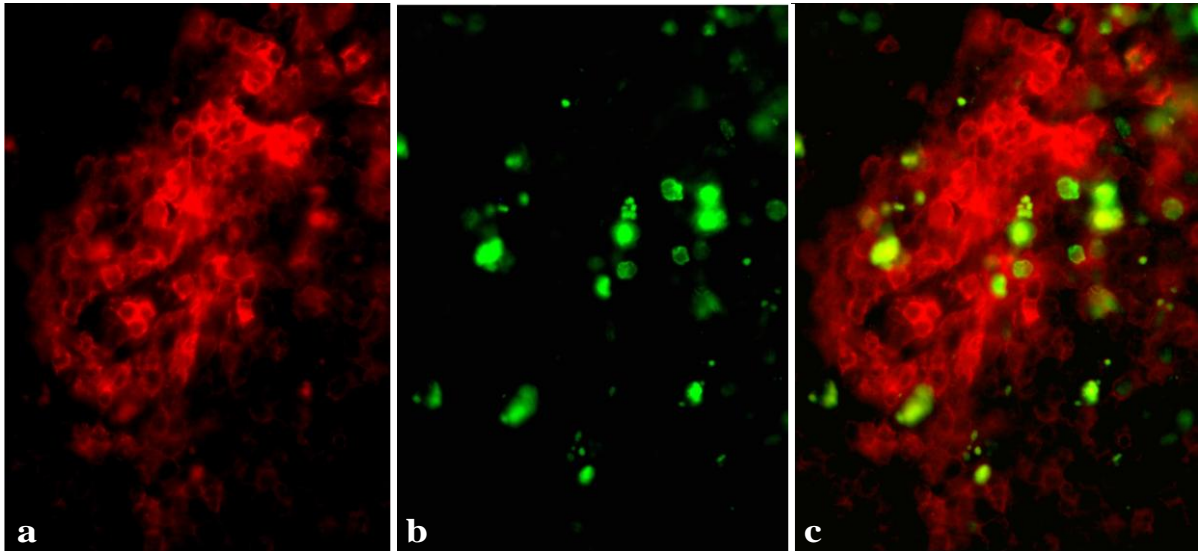
A 7H3+ sejtek karakterizálására első lépésben összehasonlító festéseket végeztünk B és T lymphocytá markerekkel. A madarak B lymphocytáit specifikusan jelölő Bu-1 antitesttel a bursai folliculusok teljes egésze jelölődött (5/b kép). Ehhez hasonló festést adott, a szintén B sejtekre jellemző EIV-E12 ellenanyag is (5/c kép). Csirkében az LT2 molekulát, mint kortikális B sejtekre jellemző antigént írták le (Sayegh és mtsai, 2000). Az LT2 ellenanyag a gyöngytyúk bursában is hasonló módon, a folliculusok kéregállományának sejtjeit jelölte (5/d kép). Az LT2+ sejtek nem alkotnak a 7H3-ra jellemző sejtklónokat, inkább elszórtan lokalizálódnak.

A T lymphocytákat CD3 antitesttel azonosítottuk. CD3+ sejteket főleg az interfollikuláris epithelium (IFE) alatti kötőszövetben, a folliculusok nyakánál tapasztaltunk, de elszórtan a kéregállományban is előfordult egy-egy CD3+ sejt (5/e kép). 7H3 és CD3 kettős immunfluoreszcenciát alkalmazva a 7H3+ sejt-aggregátumokon belül csak elvétve, egy-két sejt volt 7H3+/CD3+ fenotípusú (5/f kép). A sejtek többsége a B sejt specifikus Bu-1 antitesttel mutatott kolokalizációt (5/g kép). Ezek a festések azt igazolták, hogy a 7H3+/Bu-1+ sejtcsoportok, a gyöngytyúk bursai B lymphocyták egy populációját jellemzik.

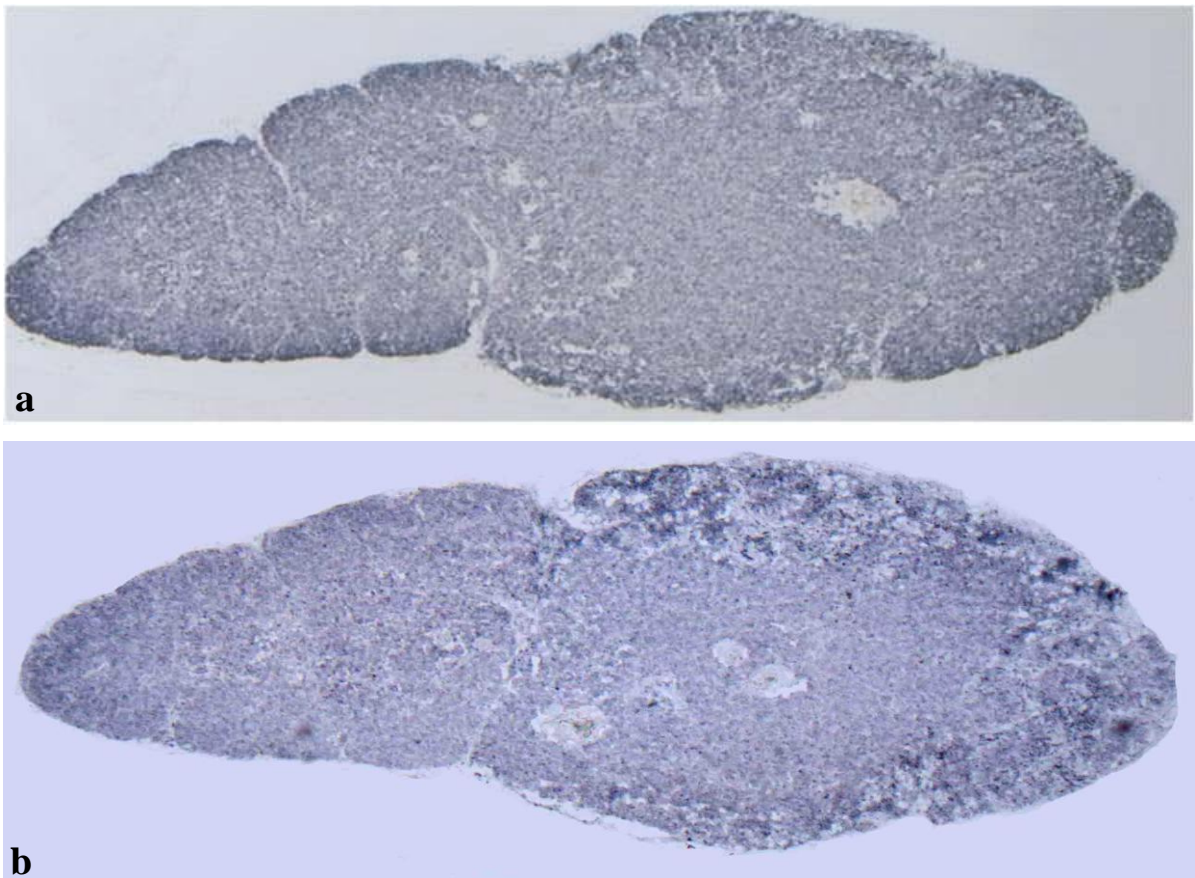
A 7H3+ sejtek pontos lokalizációjának meghatározására laminin és 7H3 antitestekkel kettős immunfluoreszcens festést készítettünk. A laminin festés láthatóvá tette a bursai folliculusok kortiko-medulláris határát képező hámsejtek, valamint a kéregállomány kapillárisait bélelő endothel sejtek basalis membránját (5/h kép). A kettős jelölést követően megfigyeltük, hogy a 7H3 által jelölt B lymphocyták csak a kéregállományban jelenlévő, lamininnal kirajzolt kapillárisok körül lokalizálódnak, illetve a lumenükben is megfigyelhetőek (5/i kinagyított kép).



5. kép: A 7H3 antitest festési mintázatának összehasonlítása különböző lymphocyta markerekkel, 10 hetes gyöngytyúk bursa Fabricii folliculusaiban. a.) A 7H3+ sejtek a bursai folliculusok kéregállományában (C: cortex) csoportokban lokalizálódnak (M: medulla). b.) Bu-1 és c.) EIV-E12 antitestekkel homogéneen jelölődnek a kortikális (C) és a medulláris (M) B lymphocyták is. d.) LT2 antitesttel a kortikális B sejtek csak egy része festődik. e.) CD3 festéssel jelölődő T sejtek csak az interfollikuláris epithelium (IFE) alatti kötőszövetben figyelhetők meg (piros nyilak). f.) 7H3 (piros) és CD3 (zöld) kettős immunfluoreszcens festéssel csak néhány sejt mutat kolokalizációt (sárga nyilak), míg g.) 7H3 (piros) és Bu-1 (zöld) kettős immunfluoreszcens festés esetén, valamennyi sejt kolokalizál (sárga színű sejtek). h.) Laminin (zöld) / 7H3 (piros) / DAPI (kék) hármas immunfluoreszcens jelölés: a laminin festéssel jelölődik a kortiko-medulláris (CM) határ valamint az erek fala. i.) A kéregállományban (C: cortex) a 7H3+ sejtek (piros) a laminin (zöld) által kirajzolt érfal (ÉF) körül csoportosulnak (kinagyított felvétel).



6. kép: *Osztódó sejtek detektálás immunfluoreszcens jelöléssel, a bursai folliculusok kérégállományi 7H3-pozitív sejtcsoportjaiban. a.) 7H3-pozitív sejtcsoport a folliculusok kérégállományában b.) foszfo-hisztin H3 antitesttel az osztódó sejtek jelölődnek c.) 7H3 (piros) és foszfo-hisztin H3 (zöld) kettős immunfluoreszcens jelöléssel, csak néhány osztódó 7H3+ sejt (sárga színű sejtek) detektálható.*



7. kép: *A 7H3 antigén kifejeződése 3 hetes gyöngytyúk thymus lebenyében. a.) A 7H3 antitest a thymus kérég- és velőállományi T lymphocytáit egyaránt jelöli, hasonlóan b.) a CD3 antitest jelöléséhez.*

A 7H3+ sejtek csoportos megjelenése miatt felmerült, hogy az ellenanyag gyorsan osztódó B lymphocytá klónokat jelöl. A kérdés megválaszolására foszfo-hisztón H3 (G2 és korai telofázisban lévő sejtalkakokat jelöl) és 7H3 kettős immunfluoreszcens jelölést végeztünk 10 hetes gyöngytyúk busájából készült metszeteken. Az eredmények szerint csak néhány kettősen pozitív sejt volt látható a bursai folliculusok kéregállományában (6/c kép).

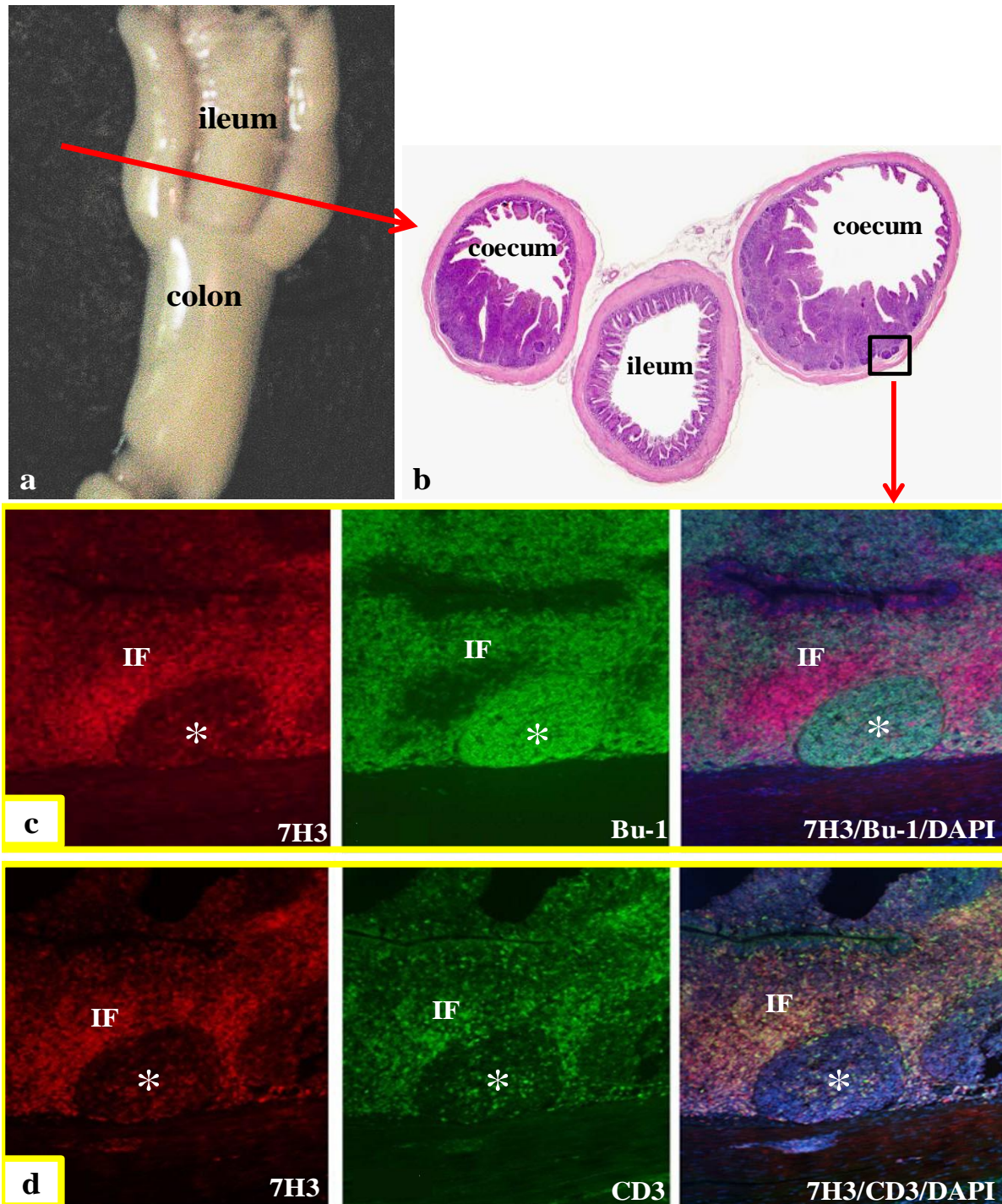
A bursa Fabricii-vel szemben, a 7H3 antitest a thymus kéreg- és velőállományának valamennyi T lymphocytáját egyenletesen jelölte (7/a kép).

2. A 7H3 antigén expressziója kifejlett állatok szekunder nyirokszerveiben

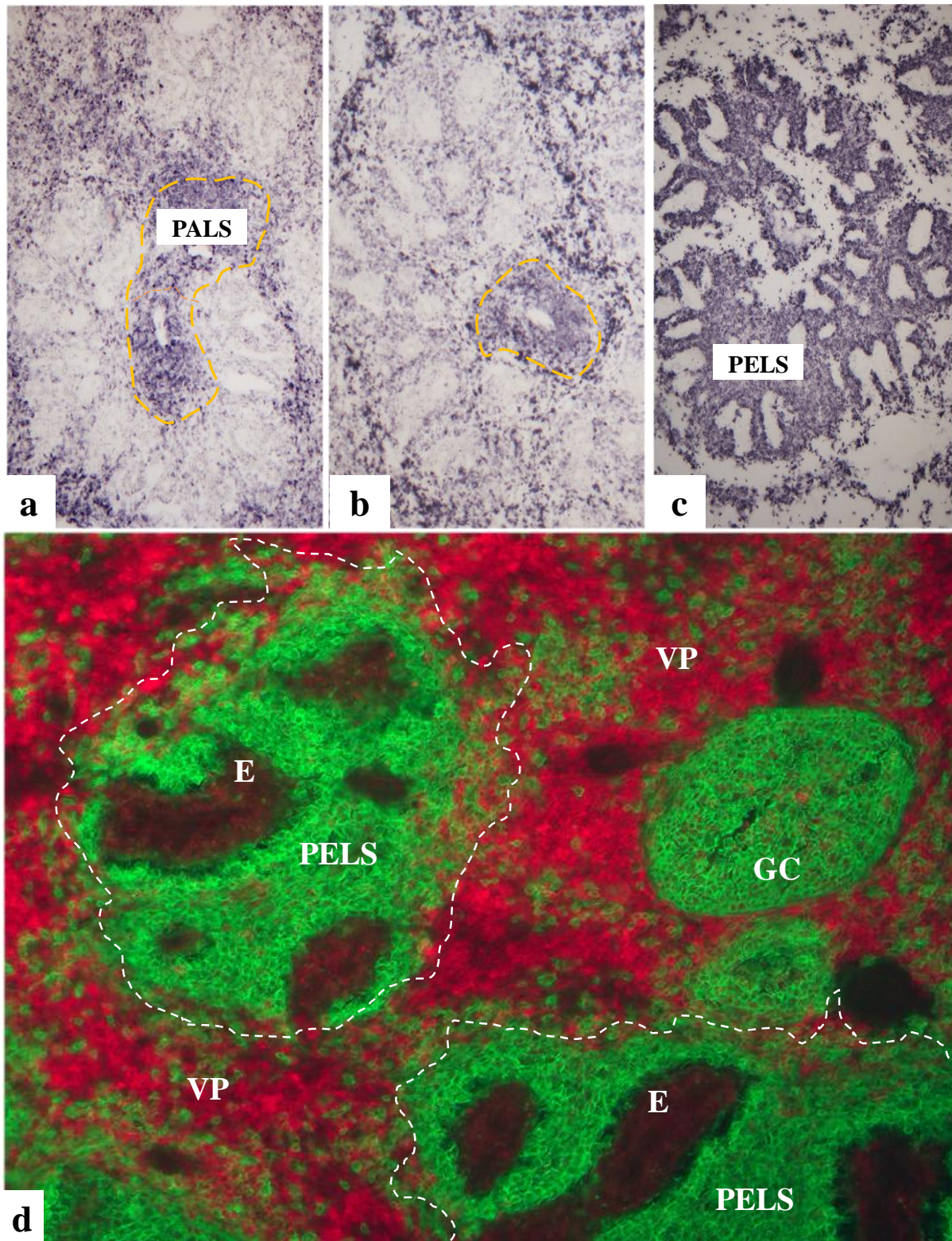
A primer nyirokszervek után a 7H3 ellenanyag tesztelését a szekunder nyirokszervekben folytattuk. A szekunder nyirokszerveken (coecalis tonsilla, lép) végzett immunjelölések alapján, 7H3 pozitivitást csak a T dependens területeken tapasztaltunk. Mivel a 7H3 ellenanyag a bursai B lymphocyták egy csoportját is jelöli, ezért kettős immunfluoreszcenciát alkalmazva a T sejtekre jellemző CD3 és a B sejteket jelölő Bu-1 antitestek bevonásával, összehasonlítottuk a 7H3 antigén kifejeződését a perifériás lymphocytá populációkon.

A coecalis tonsilla a madarak legnagyobb bélhez-asszociált szekunder nyirokszerve. A nyirokszövet anti-mesenterialisán a két coecum bázisánál található (8/a kép). Az emlősökhöz hasonlóan a tunica submucosa-t csíracentrumok, illetve lymphocytákban gazdag interfollikuláris szövet tölti ki (8/b kép; 8/c, d képsor). A 7H3 ellenanyag csak a csíracentrumok körüli interfollikuláris terület lymphoid sejtjeit jelölte, hasonlóan a CD3 T lymphocytá marker festési mintázatához, míg a Bu-1+ B lymphocyták a 7H3-at nem expresszálták (8/c, d képsor). A csíracentrumokban lokalizálódó Bu-1+ sejtek között, elszórtaan megfigyeltünk néhány 7H3+ sejtet, amelyek Bu-1 antitesttel nem jelölődtek, de a CD3-at expresszálták (8/d képsor).

A madarak lépe, akár csak az emlősöké, fehér és vörös pulpára tagolódik. A fehér pulpát a B sejtcsíracentrumok és az ecsetkapillárisok körüli periellipszoidális lymphoid hüvely (PELS), valamint a T sejtcsíracentrumok körüli periarteriális lymphoid hüvely (PALS) alkotja. A 7H3 ellenanyaggal intenzív festést kaptunk a vörös pulpa és a PALS területén is (9/a kép). Ez a mintázat nagyon hasonló volt a CD3 ellenanyaggal kapott immuncitokémiai képhez (9/b kép). A 7H3+/CD3+ területektől élesen elkülönültek a Bu-1+ B sejtcsíracentrumok és a PELS (9/d kép).



8. kép: A 7H3 antitest festési mintázata 6 hetes gyöngytyúk coecalis tonsillában. a.) A coecalis tonsilla az ileum és a colon határán, a két coecum bázisánál, anti-mesenteriólisan található (sztereomikroszkópos felvétel). b.) A coecalis tonsilla hematoxilín-eosin festett keresztmetszeti képén az aszimmetrikusan lokalizálódó nyirokszövet, coecumon belüli lokalizációja látható. c. képsor) 7H3 (piros)/ Bu-1 (zöld)/ DAPI (kék) hármas immunfluoreszcens festés. A Bu-1+ B sejtekben gazdag csíracentrum (csillaggal jelzett) 7H3 antitesttel nem festődik. d. képsor) 7H3 (piros)/ CD3 (zöld)/ DAPI (kék) hármas immunfluoreszcens festés. A T sejtekben gazdag CD3+ interfollikuláris régióban (IF) a 7H3 antitest is pozitív immunreakciót ad.



9. kép: A 7H3 antitest festési mintázata 6 hetes gyöngytyúk lépében. Egyszeres immunfestett metszetek: a.) 7H3; b.) CD3; c.) Bu-1 antitestekkel. a.), b.) A 7H3+ sejtek a CD3 antitest festési mintázatához hasonlóan, a lép T dependens periarteriális lymphoid hüvely (PALS) területén (sárga szaggatott vonal) és a vörös pulpában (VP) lokalizálódnak. c.) A Bu-1+ B dependens periellipszoidális régiót (PELS), az ecsetkapillarisok körül kialakuló ellipszoidok (E) alkotják d.) Kettős immunfluoreszcens festés (piros: 7H3 és zöld: Bu-1) jelzi, hogy a 7H3+ sejtek a lép B dependens periellipszoidális régióiban (PELS) és a csíracentrumaiban (GC) nem fordulnak elő.

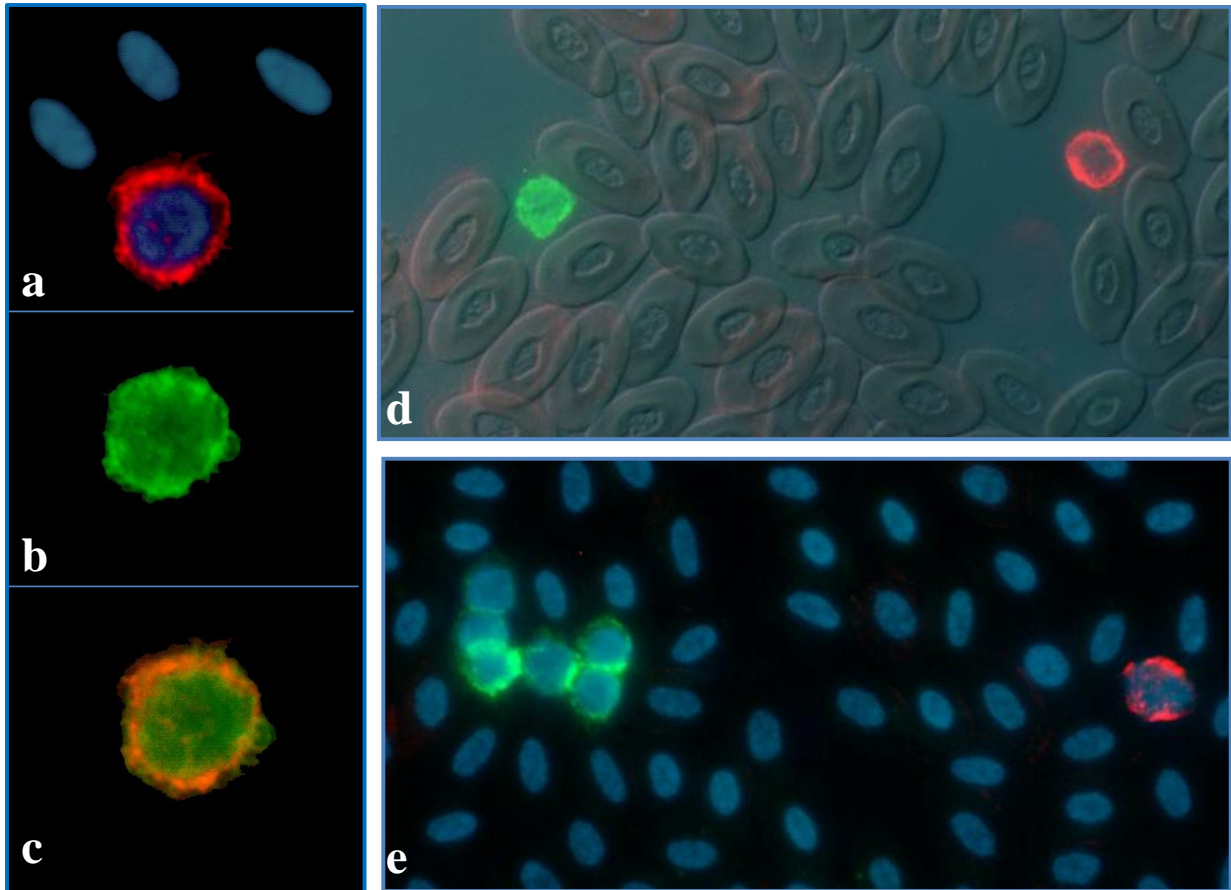
Nem lymphoid szervekben, így a központi idegrendszerben, a vesében és a tüdőben csak az erek lumenében detektáltunk 7H3+ sejteket. Különböző fajokkal való keresztreakcióját csirke, pulyka, fűrj, patkány, béka és humán szöveteken is megvizsgáltuk, de az ellenanyag egyik gerinces fajban sem keresztreakált.

A felnőtt szervekben végzett immunfestések alapján úgy tűnik, hogy a 7H3 valamennyi T lymphocytára és a bursai B lymphocyták egy kéregállományi szubpopulációjára specifikus marker.

3. A 7H3 antigén sejtbeli lokalizációjának meghatározása

A 7H3 antigén sejten belüli lokalizációjának meghatározása céljából, vérkeneten kettős immunfestéseket készítettünk olyan markerekkel, amelyek a 7H3-hoz hasonló méretű alakos elemeket jelölnek. A madarak sejttaggal rendelkező thrombocytáinak jelölésére egy szintén laboratóriumunkban készült, gyöngytyúk specifikus monoklonális ellenanyagot, a GTr1-et alkalmaztuk (Bódi és mtsai, 2009). A különböző granulocyták jelölésére sajnos nem állt rendelkezésünkre megfelelő marker, de erősen lebenyezett sejttagjuk alapján, DAPI magfestéssel könnyen elkülöníthetők a vér többi alakos elemétől. A lymphocyták jelölésére CD3 és Bu-1 antitesteket használtunk. A kettős jelölések során a 7H3 kerekded morfológiájú, mononukleáris sejteket festett, amelyek egyben CD3 pozitívást is mutattak (10/a, c kép), ellenben a hasonló méretű és morfológiájú Bu-1+ B lymphocytákat, a csoportosan megjelenő thrombocytákat és a lebenyezett sejttagvú granulocytákat nem jelölte (10/d, e kép).

A vérkeneten végzett immunfluoreszcens festésekkel nemcsak a vérsejtek tipizálását végeztük el, hanem a 7H3 antigén sejten belüli lokalizációját is meghatároztuk. Az immunfluoreszcensen jelölt képek alapján kijelenthetjük, hogy a 7H3 antigén a cirkuláló T lymphocyták sejt felszínén lokalizálódó molekula (10/a kép).



10. kép: 10 hetes gyöngytyúk vérkenet kettős immunfluoreszcens jelöléssel. [a: 7H3 (piros) és DAPI (kék); b: CD3 (zöld); c: 7H3 (piros) és CD3 (zöld); d: 7H3 (piros) és Bu-1 (zöld); e: 7H3 (piros) és GTr1 (zöld)] a.), c.) A 7H3 antitest lymphocytákra jellemző kerekded morfológiájú sejteket gyűrűszerűen jelöl, amelyek egyben CD3 pozitívak is. d.) A hasonló méretű Bu-1+ B lymphocytákat (zöld) és e.) a csoportosan megjelenő thrombocytákat (zöld) a 7H3 (piros) nem jelöli.

4. A 7H3-pozitív sejtek vizsgálata az embrionális fejlődés során

4.1. A 7H3-pozitív sejtek megjelenése a korai embrióban

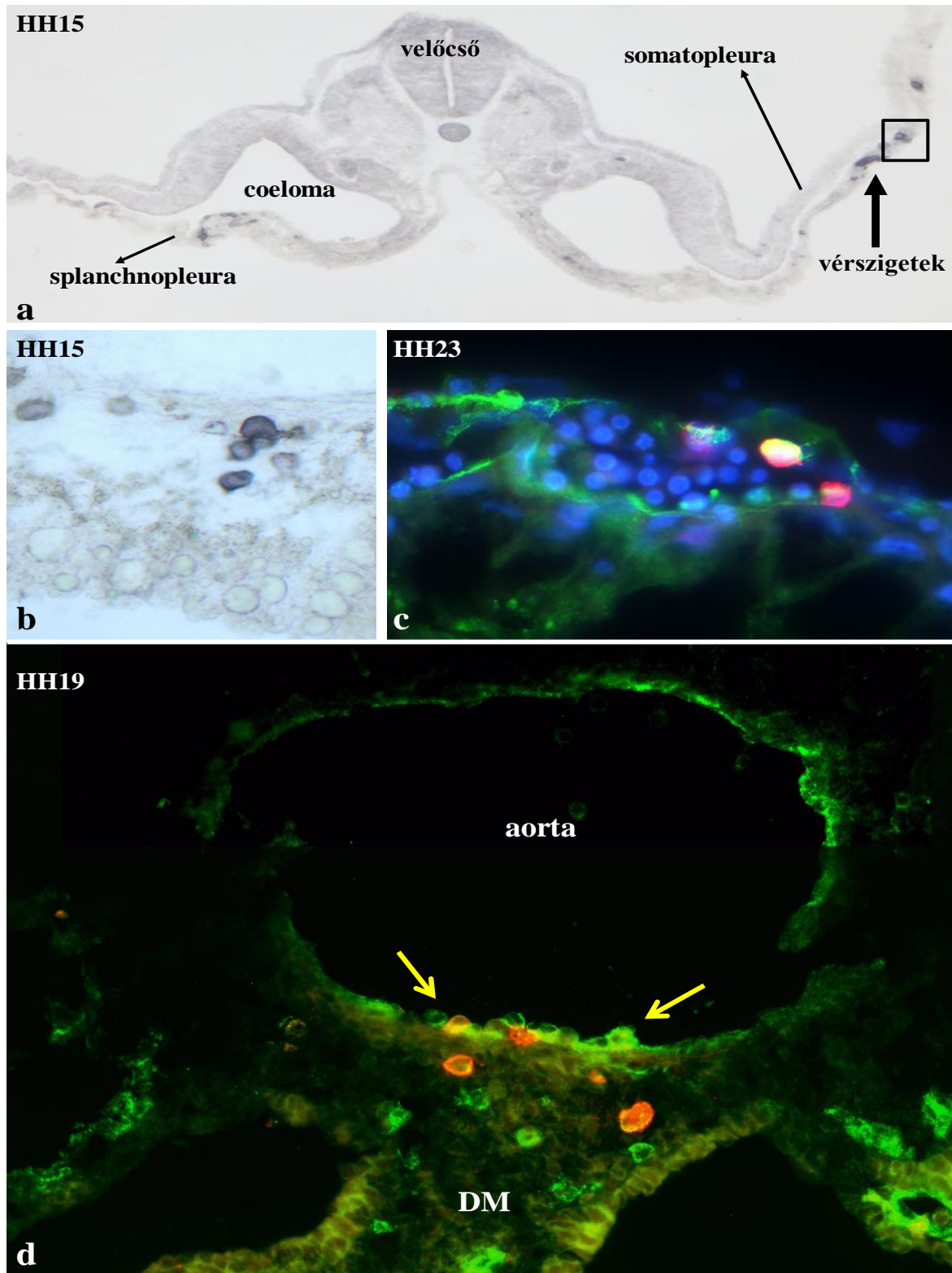
A 7H3 antitest által felismert molekula további karakterizálása céljából, megvizsgáltuk az antigén embrionális megjelenését is. Az embrionális fejlődés során az első 7H3+ sejteket 2 napos, Hamburger-Hamilton (HH) beosztás szerint 15. stádiumú embrió szikhólyagjában figyeltük meg (11/a, b kép). Ezek a nagyméretű, kerekded morfológiájú sejtek a szikhólyag vérszigeteiben fordultak elő, kis csoportokat alkotva egymáshoz, valamint a fejlődő endotheliumhoz kapcsolódtak (11/b kép). A korai megjelenés, a sejtek lokalizációja és morfológiája hemopoietikus eredetre utalt. Ennek bizonyítására kettős jelölést alkalmaztunk a QH1 antitesttel, amely egy fűj specifikus, korai hemopoietikus sejteket, valamint endothelt jelölő marker (Pardanaud és mtsai 1987). A QH1 ellenanyag keresztreagál gyöngytyúkkal is (saját megfigyelés). A QH1 kirajzolta a fejlődő szikhólyag falában az endotheliumot és

egyben jelölte a szomszédságában lévő 7H3+ sejteket is (11/c kép). Eredményünk szerint a 7H3 antitest extraembrionálisan megjelenő vérképző őssejteket jelöl.

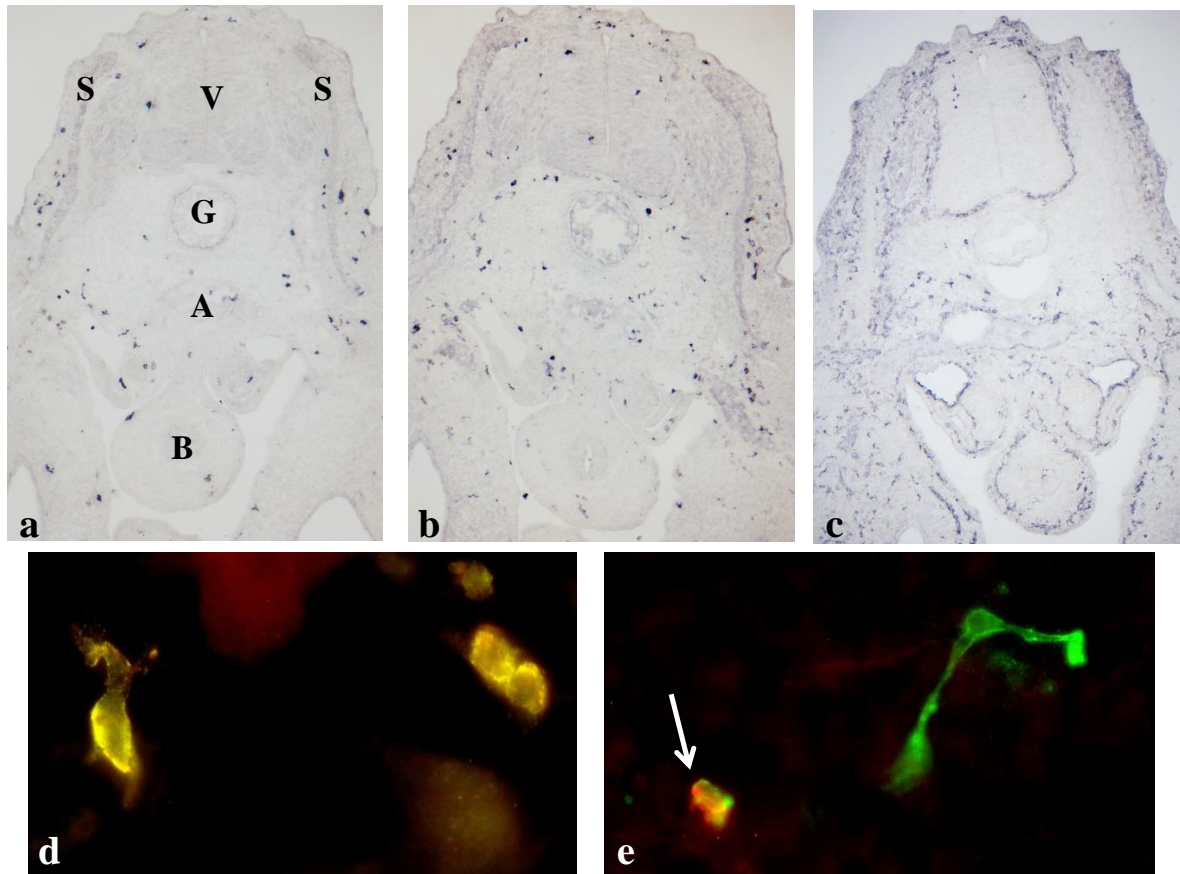
A 7H3 antigén hemopoietikus sejtekre jellemző expresszióját későbbi stádiumokban is, így az intraembrionális vérképző helyeken (intra-aortikus redő), az intraembrionális mesenchymában és a fejlődő primer nyirokszervekben is nyomon követtük. Az intraembrionális vérképzés a harmadik embrionális nap után veszi kezdetét. A páros aorta fúzióját követően, annak ventrális falát alkotó endothel sejtekből burjánzással képződnek az intra-aortikus sejt aggregatumok (2. kép). Jelenlegi elképzelések szerint, génexpressziós és funkcionális adatok alapján, az aorta régió sejtjei képezik a felnőttkori vérképzés alapját (Orkin és Zon, 2008).

A 7H3 ellenanyaggal 3 napos embrióban (HH19), az aorta ventrális falában megjelenő intra-aortikus redőben, valamint közvetlenül az alatta lévő dorsalis mesenteriumban is találtunk pozitív sejteket (11/d kép). Az intra-aortikus redő hemopoietikus jellege miatt, intenzív festődést mutatott a QH1 antitesttel is. A QH1 és 7H3 kettős festés nem adott teljes átfedést. A 7H3 csak néhány kerek, QH1+ sejtet jelölt, de az endothelt nem festette.

A 7H3+ hemopoietikus sejtek további karakterizálása céljából CD45 immunfluoreszcens jelöléseket is végeztünk. A gyöngytyúk CD45 antigénjét (közös leukocyt marker) a K55 elnevezésű antitesttel mutattuk ki (Chung és mtsai, 1991). A CD45 a felnőtt állatok leukocytáinak és az embrió hemopoietikus sejtjeinek jellemző felszíni molekulája. 2 napos gyöngytyúk embrióban CD45+ sejteket nem sikerült azonosítanunk, de az 5 napos embrió mesenchymájában már nagyszámú, elszórtan lokalizálódó, erősen festődő sejtet találtunk (12/b kép). Ezeket a sejteket morfológiájuk alapján 2 csoportba lehetett osztani: kerekded és nyúlványos sejtformákra. A CD45 festéshez nagyon hasonlóan kerekded és nyúlványos sejtekből álló pozitivitást tapasztaltunk a 7H3 antitest alkalmazásakor is, de a nyúlványos sejtformán gyengébb expressziója volt detektálható (12/a kép). Kettős immunfluoreszcenciát alkalmazva azt tapasztaltuk, hogy ez a két antitest, mind a kétféle sejtalak jelölésében jelentősen átfed (12/d kép), viszont a 7H3+/CD45+ sejtek többsége kerekded morfológiával rendelkezett. A 7H3-/CD45+ expresszió kifejezetten a nyúlványos morfológiájú sejtekre volt jellemző. Ebben a stádiumban a QH1 antitest a fejlődő erek endotheliuma mellett, a kerek és nyúlványos sejteket egyaránt jelölte (12/c kép). QH1 és 7H3 kolokalizációt a kerekded sejteken figyeltünk meg (12/e kép).



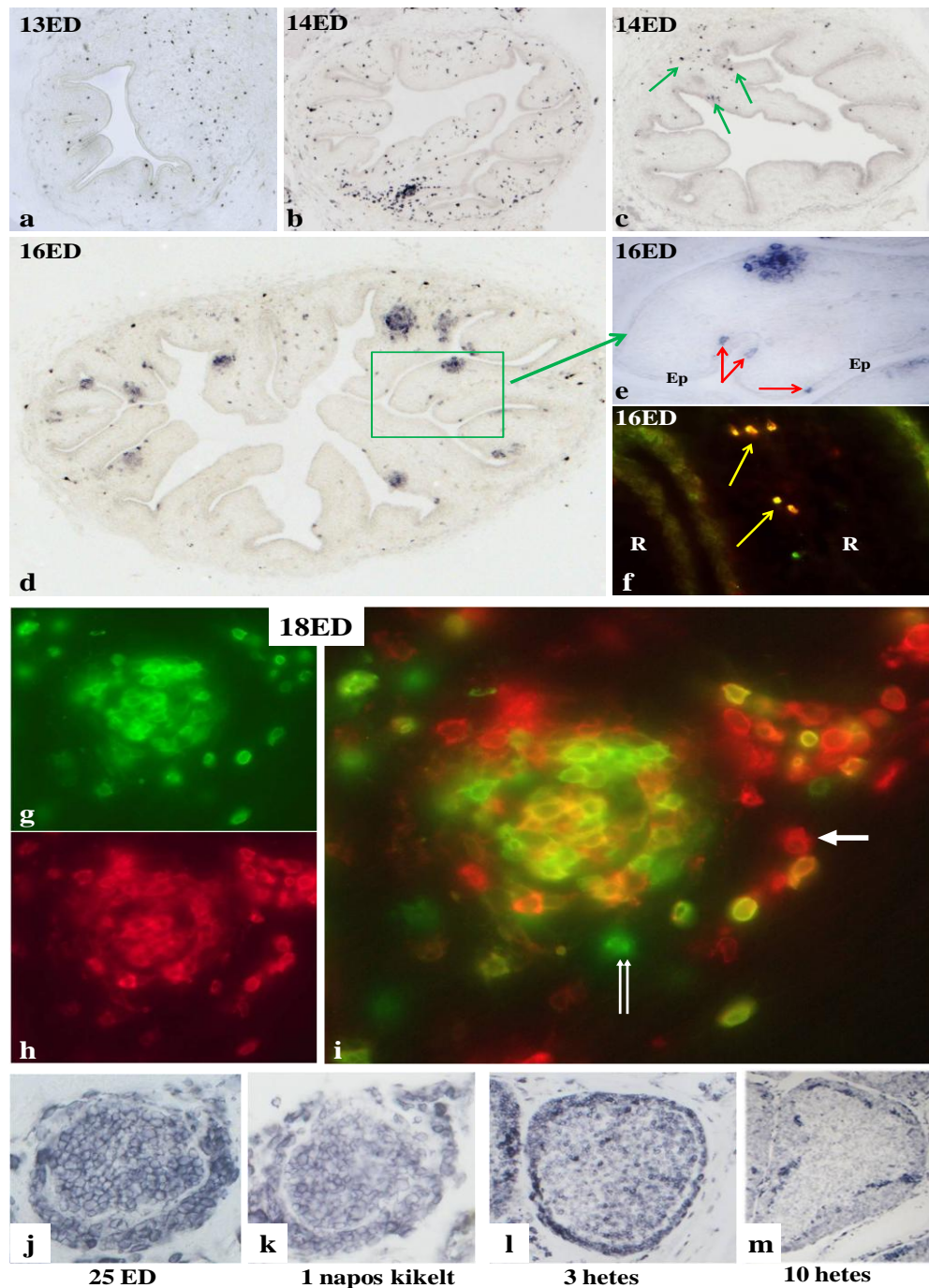
11. kép: A 7H3 antigén megjelenése korai gyöngytyúk embrióban. a.) A 7H3 ellenanyaggal 2 napos embrió szikhólyagjában, intenzív pozitívást mutató, kerekded morfológiájú sejtek jelölődtek. b.) Kinagyított kép a HH15 embrió 7H3+ sejtjeiről c.) Kettős immunfluoreszcens festés 7H3 (piros) és QH1 (zöld) antitestekkel. A kettősen jelölt (sárga színű) sejtek a vérsziget endothel sejtjeinek szomszédságában lokalizálódtak. d.) Kettős immun fluoreszcens festés 7H3 (piros) és QH1 (zöld) antitestekkel. A 3 napos (HH19) embrióban mindkét antitest által jelölt sejtek (narancsszínűek) az intra-aortikus redőben (sárga nyilak) és a dorsalis mesenteriumban (DM) fordultak elő.



12. kép: A 7H3 antigén expressziója 5 napos gyöngytyúk embrióban. Az embrióból készült sorozatmetszetek a.) 7H3, b.) CD45, c.) QH1 ellenanyagokkal festettük meg. A 7H3+, a CD45+ és a QH1+ sejtek nagyon hasonló eloszlást mutattak. A jelölt sejtek elszórtnan, az intraembriónális mesenchymában és a keringésben fordultak elő, habár c.) a QH1 ellenanyag a fejlődő erek endotheliumát is festette. d.) Kettős immunfluoreszcens festés 7H3 (piros) és CD45 (zöld) antitestekkel, ahol a nyúlványos és a kerek sejtalakok esetén is megfigyelhető a kolokalizáció. e.) Kettős immunfluorszcens festés 7H3 (piros) és QH1 (zöld), csak a kerek morfológiájú sejtek mutatnak kettő jelölést (nyíl). [V: velöcsö; S: szomita; G: gerinchúr; A: aorta; B: bélcsö]

4.2. A 7H3 expressziója a bursa Fabricii fejlődése során

Gyöngytyúkban a bursa Fabricii a 14. embrionális napon hámtelepéből és az azt körülvevő mesenchymából áll (Nagy és mtsai 2001). Az első 7H3+ sejtek a 13-14 napos bursa mesenchymájában jelennek meg (13/a, b kép). A 13 napos embrió bursa telepét először csak 7H3+ sejtek kolonizálják (13/a kép). Egy nappal később nagyszámú 7H3+ sejt lokalizálódik a fejlődő redők mesenchymájában és néhány sejt a felszíni ephiteliumot is kolonizálja (13/b kép). Ebben a stádiumban jelennek meg az első Bu-1+ B lymphocytá prekurzorok a bursa mesenchymájában (13/c kép).



13. kép: A 7H3-pozitív sejtek vizsgálata a bursa Fabricii ontogenezise során. a.) Az első 7H3+ sejtek 13 napos embrió bursa mesenchymájában jelennek meg. b.) A 14 napos embrióban a fejlődő bursa redőket nagyszámú 7H3+ sejt tölti ki. c.) Néhány Bu-1+ B lymphocita megjelenik a bursa mesenchymájában (zöld nyíl). d.) Két nappal később, a kialakuló follikulum bimbókat kolonizálják a 7H3+ sejtek. e.) Kinagyított képrészlet a 12/d képről (Ep: epithelium). f.) Bu-1 (zöld) és 7H3 (piros) kettős festés kolokalizációt mutat a bursa redőinek (R) tengelyében található B sejt prekurzorokon. g.) Bu-1 és h.) 7H3 festés 18 napos embrióban. i.) A 18. embrionális napon látszólag valamennyi B lymphocita expresszálja a 7H3 antigént (sárga színű sejtek). Néhány sejt csak Bu-1+/7H3- (↑↑) vagy Bu-1-/7H3+ (↑) fenotípusú. j-m.) A kikelés után a 7H3 fokozatos expressziós lecsengése figyelhető meg. j, k.) A kikelés előtt és után 1-2 nappal a 7H3 látszólag még valamennyi B lymphocytát jelöli. l.) Három hetes korban a kortikális B lymphocyták intenzíven festődnek. m.) 10 hetes korra csak az elszórt sejtcsoportok jelölődnek.

A 16. embrionális naptól kezdve már a kialakuló folliculus bimbók epitheliumában, valamint közvetlenül a hám alatt detektáltuk 7H3-mal festődő sejteket, ezzel párhuzamosan viszont, a mesenchymálisan lokalizálódó 7H3+ sejtek száma jelentősen csökkent (13/d, e kép). Kettős immunfluoreszcens jelölést alkalmazva azt tapasztaltuk, hogy a redők tengelyében megfigyelhető Bu-1+ B sejt prekurzorok is jelölődtek a 7H3 antitest által (13/f kép).

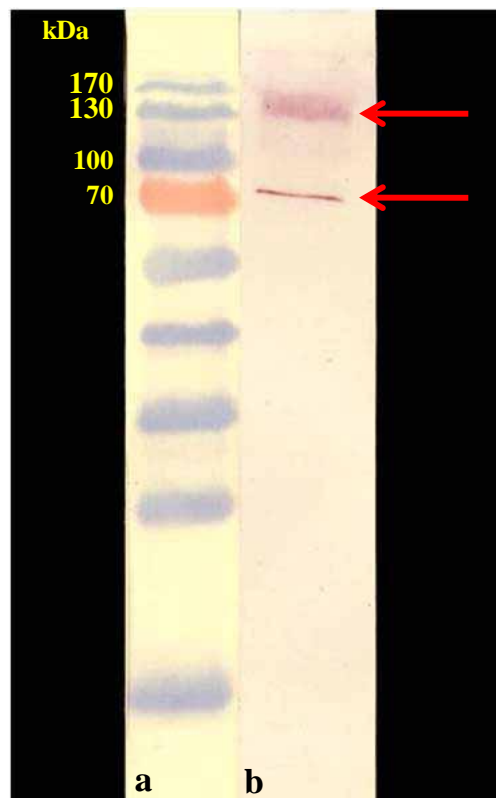
18 napos embrió bursájában már nagyszámú folliculus bimbó volt megfigyelhető. Az ezeket kitöltő Bu-1+ B lymphocyták nagy része expresszálta a 7H3 antigént, habár elszórtan találtunk 7H3+/Bu-1- vagy 7H3-/Bu-1+ fenotípusú sejteket is (13/g, h, i kép). A kikelésig és az azt követő pár napig, a bimbókat kitöltő B lymphocyták egyenletesen fejezték ki a 7H3 antigént (13/j, k kép). A kikelés után az antigén fokozatos expressziós lecsengést mutatott, amely először a velőállomány sejtjein jelentkezett (13/l kép), a 10. hétre pedig a 7H3 expressziója, csak a kéregállomány izolált sejtcsoportjaira volt jellemző (13/m kép).

Korábbi eredmények alapján, a 18 illetve 20 napos embrió thymusának valamennyi sejtje (a felnőttekhez hasonlóan) 7H3 pozitivitást mutatott. A különböző korú embriók primer nyirokszervein végzett immunfestések alapján úgy tűnik, hogy a 7H3 antitest embrionális korban valamennyi bursai B lymphocytát és a T lymphocytákat is jelöli.

5. A 7H3 antitest által jelölt antigén molekulatömegének meghatározása

A molekulatömeget thymus lizátumból határoztuk meg gélelektroforézissel és Western-blottal. A gyöngytyúkból eltávolított és megtisztított thymus lebenyekből, thymocita szuszpenziót készítettünk. Centrifugálást követően a kiülepedett sejteket RIPA pufferrel kezeltük. A kapott fehérje lizátumot lecentrifugáltuk és a felülúszóját használtuk fel a gélelektroforézishez és a blottoláshoz.

Reduktív körülmények között 7H3 antitest egy 70 kDa és egy 140 kDa tömegű molekulákat ismer fel (14/a kép).



14. kép: 7H3 antitest által jelölt antigén molekula tömegének meghatározása Western-blottal. a.) molekula standard. b.) A 7H3 antitest által jelölt molekulák tömege (piros nyílak).

Megbeszélés

Az immunológiai kutatásokban a madarak különleges primer nyirokszervük a bursa Fabricii miatt, egyedülálló lehetőséget nyújtanak a B lymphocyták fejlődésének, differenciálódásának és érésének tanulmányozására.

Az elmúlt három évtizedben számos olyan monoklonális ellenanyag készült, amely alkalmas a madarak B lymphocytáinak szelektív jelölésére. Ezek között vannak olyan antitestek is, amelyek kifejezetten a bursa Fabricii kortikális B lymphocytáit, vagy csak egy B lymphocytá populációt jelölnek, esetleg egy adott differenciálódási stádiumhoz köthető sejtfelszíni molekulát ismernek fel. A lymphocytákat jelölő antitestek nagy segítséget nyújtanak a bursa Fabricii-ben zajló mechanizmusok megértéséhez. Ma már számos olyan monoklonális ellenanyag is elérhető a kereskedelemben, amely nemcsak a csirke lymphomyeloid sejtjeire specifikus, hanem a fürj, gyöngytyúk vagy a pulyka lymphocytáit jelölik. Ezekkel a markerekkel a vadon élő madarak immunrendszere is tanulmányozható és az eredményeket összehasonlíthatóak a belterjes csirke törzsekben végzett immunológiai vizsgálatokból kapott eredményekkel.

Szakdolgozatomban a 7H3 elnevezésű, IgG2b izotípusú, gyöngytyúk specifikus egér monoklonális ellenanyag immuncitokémiai karakterizálását végeztem. A felnőtt állat bursa Fabricii folliculusainak kéregállományában azt tapasztaltuk, hogy a 7H3 ellenanyag elszórtan megjelenő, izolált sejtszöveteket jelöl, valamint intenzíven festi a thymus kéreg- és velőállományi sejtjeit és a perifériás nyirokszervek T dependens területeit. Kettős immunhisztokémiai festésekkel kimutattuk, hogy a 7H3 antitest felnőtt gyöngytyúk T lymphocytáit illetve, a bursa Fabricii folliculusainak egy B lymphocytá populációját jelöli, amelyek a kéregállomány kapillárisai körül, csoportokat alkotva figyelhetők meg. Áttekintve a madarak lymphoid sejtjeire vonatkozó szakirodalmat, ez a festési mintázat eltérést mutatott a madarak B lymphocytáit jelölő egyéb antitestekétől.

A szakirodalomból számos olyan marker ismert, így például a CB11 és Hy86b5 ellenanyagok, amelyek a 7H3-hoz nagyon hasonló módon, B lymphocytá szubpopulációkat jelölnek a bursai folliculusok kéregállományában és ezen kívül a T lymphocytákat is festik (Olson és Ewert, 1990). Mindkét említett antitest által jelölt antigén különlegessége, hogy a fejlődés során lecsengést mutat. Csirkében az embrionális fejlődés 12. napjától kezdve a CB11 és Hy86b5 antitestek a fejlődő bursai folliculusokat kitöltő valamennyi B lymphocytát jelölik, de a kikelés előtt az általuk felismert antigéneknek egy drasztikus expressziós

lecsengése figyelhető meg, leszűkülve a kéregállomány egy szubpopulációjára (Olson és Ewert, 1990).

Embrionális és fiatal kikelt gyöngytyúkokon végzett vizsgálataink során, a 7H3 antigén esetében is megfigyeltünk hasonló expressziós lecsengést a bursai B lymphocytákon, de ellentétben a CB11 és Hy86b5 antigénekkal, ez a kikelést követően történik. Embrionálisan, a bursai folliculus bimbókat kitöltő valamennyi B lymphocytá kifejezi a 7H3 által jelölt molekulát. A kikelés körül a 7H3 antitest még a legtöbb folliculáris B lymphocytát jelöli, majd a kelést követő 3. héttől, a medulláris sejteken csökken az expresszió mértéke, fokozatosan leszűkülve a kéregállomány B sejtjeire. A 10. héttől kezdve csak a kapillárisok körüli, izolált sejtcsoportokat festi, s az elkövetkező hetekben ez a festési mintázat változatlan marad (az állatokat 16 hetes korig vizsgáltuk). A 7H3 antitest a CB11-től és Hy86b5-től nemcsak a lecsengési mintázatában, hanem az általa jelölt antigén molekula tömegében is eltérést mutat. Western-blot analízis során megállapítottuk, hogy a 7H3 antitest redukzív körülmények között egy 70 kDa és egy 140 kDa tömegű, feltehetőleg heterodimert képező molekulákat ismer fel, míg CB11 egy 37 kDa-os antigént, a Hy86b5 pedig egy 142 kDa-os és 162 kDa-os molekulából álló heterodimert jelöl.

Az LT2 antigént szintén a bursai folliculusok kortikális sejtjei által expresszált molekulaként azonosították. Az LT2 molekulát, hasonlóan a 7H3-hoz, embrionálisan valamennyi bursális B lymphocytá kifejezi. Sayegh és munkatársai (2000) szerint, a felnőtt állatok bursai folliculusainak kéregállományát LT2+ sejtek töltik ki és elszórtan a medullában is található pozitív sejtek. Munkánk során a gyöngytyúk bursai folliculusainak kéregállományában azonosítottunk LT2+ sejteket, amelyek nem alkottak a 7H3-ra jellemző sejtklónokat, inkább elszórtan lokalizálódtak.

Emlősökben a CD80-as molekulát, amely a T sejtek felszínén jelenlévő CD28-al kapcsolódva segíti elő a T sejtek aktivációját, különböző antigént prezentáló sejtek (monocytá/macrophag, dendritikus sejtek és B lymphocyták) fejezik ki. A közelmúltban Sung Hyen Lee és munkatársai (2011) létrehoztak egy egér monoklonális ellenanyagot, amely a csirke CD80-as (chCD80) molekuláját ismeri fel. Az anti-chCD80 antitesttel a lép fehér pulpájában és a bélben dendritikus sejteket, illetve a lép vörös pulpájában monocytákat azonosítottak. Továbbá, pozitív immunreakciót kaptak a bursa folliculusainak kéregállományában, ahol a chCD80+ sejteket monocytaként jellemezték. Habár a 7H3 és a chCD80 bursai folliculusokban mutatott festési mintázata hasonló, a 7H3 nem jelöli a dendritikus sejteket és a monocytákat sem. Összehasonlítás céljából az amerikai laboratórium hamarosan rendelkezésünkre bocsájtja az anti-chCD80 ellenanyagot.

A 7H3 antigénhez hasonló, korai embrionális megjelenést mutat a 11A9 monoklonális ellenanyag által jelölt chL12 vagy más néven Ov antigén is (Houssaint és mtsai, 1991). A legelső Ov+ sejteket 3 napos csirke embrió szikhólyagjának vérszigeteiben azonosították, majd idősebb embriókban (ugyanúgy, mint a 7H3), a CD45+ sejtek is expresszálják az Ov antigént. A 14 napos embrió bursájának valamennyi Bu-1+ B sejtje, valamint a thymust kolonizáló T sejt prekurzorok is jelölődnek a 11A9 antitesttel. A kikelést követően viszont a bursai B lymphocytáknak csak 4%-a festődik. Későbbi publikációkban megállapították, hogy a bursai B sejtek közvetlenül a perifériára való emigrálásuk előtt kezdik el kifejezni az Ov antigént, mivel a perifériás B lymphocyták (a T lymphocytákkal azonos módon) szintén expresszálják (Paramithiotis és Ratcliffe, 1993). Ezzel ellentétben a 7H3 antitest a perifériás B lymphocytákat nem jelöli, és az általa felismert molekulák tömege is különbözik a 35 kDa-os Ov antigénétől.

Madarakban a B sejt fejlődés három diszkrét fázisra tagolható: pre-bursális, bursális és a bursa involúcióját követő post-bursális stádiumokra (Ratcliffe, 1985). Napjainkig a legjobban feltárt és tanulmányozott a pre-bursális őssejtek populációja, tehát azok a B lymphocytá prekurzorok, amelyek a korai embrióban képződnek, megindul bennük az immunglobulin gének átrendeződése, majd a fejlődő folliculusokat kolonizálva, az itt végbemenő sejtosztódásukkal párhuzamosan megtörténik az immunglobulin gének génkonverziója is. Ezzel szemben a kikelést követően, az érett bursai mikro környezetben történő B sejtek érési folyamatairól, a bursa involúcióját követő perifériás B lymphocyták fejlődéséről, jelenleg kevés információ áll rendelkezésünkre. A szakirodalom egyik legvitatottabb tárgya a kikelést követően kialakuló bursai folliculusok kéregállományának a funkciója. Ratcliffe és munkatársai (1987) szerint, a bursa folliculusok kéregállományát a velőállományból kivándorló sejtek hozzák létre. A kitelepedett kortikális B lymphocyták intenzív proliferációval felszaporodnak és fokozatosan a perifériára vándorolnak (Paramithiotis és Ratcliffe 1994). Toivanen és Toivanen (1973) csirkén végzett immunológiai és sejtttranszplantációs kísérleteik során különítették el az ún. bursális és post-bursális őssejteket. Ezek a sejtek megjelenésüket és funkciójukat tekintve is különböztek egymástól. A bursális őssejtek, teljes mértékig képesek a B sejt depletált bursa rekonstrukciójára a kikelést követő körülbelül 3. hétig. A bursális őssejteknek ez a képessége a 3. héttől kezdve fokozatosan csökken, csak részben tudják helyreállítani a bursa struktúráját és a 10. hétre teljesen megszűnik. A bursális őssejtek helyét a 10. hét után a post-bursális sejtek veszik át, de ezek már nem képesek a bursai folliculusok rekonstrukciójára.

A 7H3 antigén embrionális B sejteken való expressziója és a kiképzést követő fokozatos lecsengése alapján feltételezzük, hogy a 7H3 antitest a felnőtt állatok azon bursai sejteit jelöli, amelyek képesek a folliculusok rekonstrukciójára. A 7H3 antigén időbeni lecsengése, amely egybeesik a korábban publikált bursai őssejtek jelenlétével (Toivanen és Toivanen, 1973) szintén alátámasztja feltételezésünket, miszerint a 7H3 ellenanyag szelektíven jelöli a bursális őssejteket. Ennek a feltevésnek az igazolására, a jövőben olyan vizsgálatokat is tervezünk, ahol áramlási citometriával szétválasztjuk a bursa 7H3+ és 7H3- B lymphocytá populációit és megismételjük a korábban publikált bursa rekonstrukciós kísérleteket.

A 7H3 antitest a lymphocyták mellett, már a korai vérképzés során megjelenő hemopoietikus sejteket is jelöli. A legelső 7H3+ sejteket 2 napos embrió (HH15 stádium) szikhólyagjában, valamint egy nappal később (HH19 stádium), az aorta ventrális falában megjelenő intra-aortikus redőben találtuk. Mivel az intra-aortikus hemopoiesis az embrionális fejlődés 3-4 napja között indul meg, ezért a HH15 stádiumban azonosított 7H3+ sejtek nagy valószínűséggel szikhólyag eredetűek és az extraembrionális vérképzésben vesznek részt. 5 napos embrió mesenchymájában a 7H3+ sejtek elszórtan lokalizálódtak, amelyeket morfológiájuk alapján két csoportba lehetett osztani: nyúlványos és kerekded sejtformákra. A korai hemopoietikus markerekkel, így a QH1-gyel és CD45-tel végzett kettős immunfluoreszcens festések a 7H3 antitesttel kolokalizációt mutattak. A QH1 elnevezésű ellenanyag a fűrj embriók hemopoietikus és endothel sejtjeit jelölő marker (Pardanaud és mtsai 1987), amely keresztreakál a gyöngytyúk sejtekkel is (saját megfigyelés). A QH1 antitest csirkében nem működik, ezért helyette a CD45 molekulát felismerő ellenanyagot használtuk a hemopoietikus sejtek azonosítására (Jaffredo és mtsai, 1998). A 7H3 antigén már a szikhólyag vérszigeteiben fejlődő QH1+ sejtek egy részén is jelen van, de csak a vérszigetek endothel sejtjeihez kapcsolódó, kerek morfológiájú sejteken kolokalizál a két marker. A 7H3 ellenanyag az endothel sejteket nem jelöli. A 7H3 antigén 2 napos embrióban megfigyelhető expressziója, 1-2 nappal megelőzi a CD45 molekula embrionális megjelenését de, azt követően a két ellenanyag festési mintázata nagy átfedést mutat. Ezt igazolja a 7H3 ellenanyag fejlődő bursa Fabricii-ben mutatott festési mintázata is, mivel a 7H3+ sejtek már a Bu-1+ B lymphocytá prekursorok megjelenése előtt nagyszámban kolonizálják a bursa telepét.

Komparatív immuncitokémiai adataink szerint, a 7H3 antitest egy olyan új hemopoietikus sejtekre specifikus antigént ismer fel, amely alkalmas lehet a véreredetű sejtek korai és szelektív azonosítására. A 7H3 antitest által jelölt hemopoietikus sejtek differenciálódási potenciáljának az experimentális vizsgálatára, csirke és gyöngytyúk őssejt

kimérákat (gyöngytyúk szikhólyag darabok beillesztése a csirke embriók testüregébe) tervezünk. A 7H3 ellenanyag a kimérák vizsgálatára kiválóan alkalmas eszköz lehet, mivel más madárfajokkal nem keresztreakál.

A 7H3 antigén molekula tömegét célzó biokémiai vizsgálatok során két specifikus jelet kaptunk 140 kDa-os és 70 kDa-os értékekkel. Ennek alapján, a 7H3 antitest feltehetőleg egy heterodimer fehérjét ismer fel. Az immuncitokémiai karakterizálás során megmutatta, hogy a 7H3 ellenanyag a bursai B lymphocyták egy populációját és a T lymphocytákat is festi. A Western-blot analízishez eddig thymus lebenyből készített lizátumot alkalmaztunk, de a thymus velőállományában a T lymphocyták mellett 10-15%-ban B sejtek is jelen vannak (Tamminen és mtsai, 1973). Annak a kizárására, hogy a T és B lymphocyták sejt felszínén a 7H3 nem két különböző, de azonos epitóppal rendelkező fehérjét jelöl, hanem ugyanúgy egy heterodimert ismer fel, szeretnénk B lymphocytákat tartalmazó (embrionális vagy 1-2 napos kikelt állatok) bursai sejtszuspenziójából készített mintákkal is összevetni jelenlegi eredményeinket.

Következtetések

A 7H3 egy olyan új monoklonális ellenanyag, amely különbözik az eddig ismert hemopoiitikus sejteket és kifejlett madarak B lymphocytáit jelölő ellenanyagoktól. Az ellenanyag gyöngytyúk specifikus, amely egy 70 és 140 kDa tömegű feltehetőleg heterodimert képező membrán antigént ismer fel. A 7H3 antigén a szikhólyag vérszigeteiben lévő hemopoiitikus sejteken jelenik meg, megelőzve a klasszikus CD45 hemopoiitikus antigént. A fejlődés későbbi stádiumaiban a 7H3 ellenanyag az embrionális T és B lymphocytákat egyaránt jelöli. Felnőtt állatokban a thymus, lép, coecalis tonsilla T lymphocytáit ismeri fel, míg a bursa Fabriciiben csak a kéregállomány aggregált B sejtjein marad meg. Feltételezzük, hogy a 7H3 olyan differenciálódási antigént jelöl, amely alkalmas eszköz lehet nemcsak a hemopoiitikus sejtek karakterizálására, hanem a bursa Fabriciiben fejlődő őssejt populációk összehasonlítására is.

Összefoglalás

A gerinces állatokkal foglalkozó fejlődésbiológia egyik modell állata a domesztikált csirke, mely humán élelmezés szempontjából legfontosabb fehérje forrásunk. Ezen gazdasági és élelmezési jelentősége, valamint a B lymphocytá fejlődéséért felelős, csak madárra jellemző, bursa Fabricii indokolta a madár immunológia kialakulását az 1970-es években. A madár immunológia szinte egyenlő a domesztikált csirkére vonatkozó ismereteinkkel, ezért az immunológiában használatos mono- és poliklonális ellenanyagok főleg csirke eredetű antigének ellen készültek. A vadon élő madarak immunsejtjeinek karakterizálása az immunrendszer működésének jobb megértéséhez vezethet. Szakdolgozatomban a 7H3 elnevezésű gyöngytyúk antigének ellen készült monoklonális ellenanyagról számolok be.

A 7H3 elnevezésű monoklonális ellenanyag felnőtt állatban a thymus kéreg- és velőállományának valamennyi (éretlen és érett) T sejtjeit egyaránt jelöli, míg a bursa Fabricii folliculusainak kéregállományában csak izolált sejtcsoportokat ismer fel. A velőállomány B lymphocytái 7H3 negatívak. A perifériás nyirokszövet T dependens területeinek T lymphocytái szintén expresszálják a 7H3 antigént. Macrophag, dendritikus és thrombocytá markerek nem jelölik a 7H3 pozitív sejteket. Embrionális megjelenését tekintve a 7H3 pozitív sejtek 2 napos gyöngytyúk embrió szikhólyagjának vérszigeteiben jelennek meg, és a keringés megindulását követően az erekben is kimutathatók. Ez a morfológiai megfigyelés hemopoiitikus eredetre utalt, amit a CD45 és 7H3 kettős festés is megerősített. Érdemes megjegyezni, hogy a 7H3 antigén megjelenése megelőzi a klasszikus CD45 hemopoiitikus antigénét. Citológiai és biokémiai adatok szerint, a 7H3 antitest egy 70 kDa és egy 140 kDa súlyú, feltehetőleg heterodimert képező membrán antigént ismer fel.

Összefoglalás: A 7H3 antigén a szikhólyag vérszigeteiben lévő hemopoiitikus sejteken jelenik meg, később a 7H3+ sejtek a vérkeringésben is kimutathatók. Felnőtt állatok bursájában a folliculusok kéreg-velő határán, a kapillárisok körül aggregált sejtcsoportokon van jelen. A thymusban a kérgi, éretlen és velői, érett T sejteken egyaránt expresszálódik. Feltételezzük, hogy a 7H3 ellenanyag egy olyan új differenciálódási antigént jelöl, amely alkalmas eszköz lehet a hemopoiitikus sejtek és a B lymphocyták egy szubpopulációjának karakterizálására.

Summary

The domesticated chicken is widely used animal model in vertebrate developmental biology. The bursa of Fabricius is a primary lymphoepithelial organ of birds, that is responsible for B lymphocyte maturation. This discovery in chicken resulted in the emergence of avian immunology in 1970s. Besides its scientific role chicken is the most important protein source in human nutrition. Avian immunology is almost equal to immunology of domesticated chickens, therefore monoclonal and polyclonal antibodies against avian lymphomyeloid antigens have been produced mainly against chicken. Characterization of immune cells in wild birds could lead to a better understanding of the immune system. Here, we have described a novel guinea fowl lymphocyte specific antigen, recognized by our monoclonal antibody, designated 7H3.

During the immunohistochemical characterization of the 7H3 monoclonal antibody the supernatant recognized the immature and mature T cells in the adult thymus, while in the bursa of Fabricius only isolated group of cells of the follicular cortex were positive. The medullary B lymphocytes of the bursa of Fabricius were negative for 7H3. The T-dependent areas of the peripheral lymphoid organs also express the 7H3 antigen. Macrophage, dendritic cell and platelet markers did not stain the 7H3+ (positive) cells. During embryonic development the first 7H3+ cells appeared in the yolk sac blood islands of 2-day-old guinea fowl embryo, and later were detected in embryonic circulation. In order to confirm the hemopoietic specificity of 7H3, co-stainings with CD45 were carried out. However the two antibodies recognized the same cell type in the 5-day-old guinea fowl embryo, the expression of 7H3 antigen preceded the appearance of the classical hematopoietic cell specific CD45 molecule. The 7H3 immunoreactive product showed a fine granular pattern accumulating in the cell membrane. Immunoblotting with the 7H3 antibody recognized protein bands at 70 and 140 kDa in lysates of adult guinea fowl thymus.

In conclusion: The first 7H3 + cells appear in the yolk sac blood islands and later the 7H3+ hematopoietic cell can also be detected in embryonic blood. In adult guinea fowl the 7H3 antibody recognizes T lymphocytes of the thymus and peripheral lymphoid organs and a subpopulation of cortical B lymphocytes in the bursal follicles. Based on these result, we assume that the 7H3 antibody labels a new differentiation antigen, and can be a useful marker to characterize the hematopoietic cells and B lymphocytes of the bursa of Fabricius.

Köszönetnyilvánítás

Munkám elkészítéséhez hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Nagy Nándornak a Semmelweis Egyetem Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet, Fejlődésbiológiai és Immunológiai Laboratórium vezetőjének, aki mindvégig egyengette az utamat, hasznos tanácsokkal látott el és lehetőséget teremtett e munka kivitelezéséhez.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Oláh Imrének, a Semmelweis Egyetem Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet egyetemi tanárának, aki munkámat értékes tanácsokkal segítette.

Szeretnék köszönetet mondani Bódi Ildikónak, Dr. Herberth-Minkó Krisztinának, Dr. Kocsis Katalinnak és Dr. Molnár Dávidnak, akik elméleti és gyakorlati tudásukkal, valamint barátságukkal mind végig segítségemre voltak. Továbbá köszönet illeti laboratóriumunk összes többi munkatársát, aszisztenseket, TDK-sokat. Álljon itt a nevük ABC-sorrendben: Barad Csilla, Dr. Bíró Éva, Dóra Dávid, Fügedi Jutka, Dr. Kittner Zsuzsa, Orbán Edit, Vidra Györgyné.

Hálával tartozom a Semmelweis Egyetem Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet valamennyi munkatársának, akiket itt külön nem emeltem ki, de egy-egy gesztussal megkönnyítették kutatómunkámat.

Köszönettel tartozom konzulensemnek Dr. László Lajosnak, az Eötvös Loránd Tudományegyetem Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék docensének dolgozatom elkészítéséhez nyújtott segítségéért.

Végül köszönettel tartozom Dr. Molnár Kingának, az Eötvös Loránd Tudományegyetem Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék adjunktusának, aki hasznos tanácsokkal segítette munkámat.

Természetesen köszönettel tartozom családomnak, barátaimnak, akik hihetetlen türelemmel voltak irántam és mindvégig támogattak.

Irodalomjegyzék

- Azzam HS, DeJarnette JB, Huang K, Emmons R, Park CS, Sommers CL, El-Khoury D, Shores EW, Love PE. (2001). Fine tuning of TCR signaling by CD5. *J Immunol.* 166:5464-72.
- Bikah G, Carey J, Ciallella JR, Tarakhovsky A, Bondada S. (1996). CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science.* 274:1906-9.
- Bockman DE, Boydston WR, Beezhold DH. (1983). The role of epithelial cells in gut-associated immune reactivity. *Ann N Y Acad Sci.* 409:129-44. Review.
- Boyden EA. (1922). The development of the cloaca in birds, with special reference to the origin of the bursa of fabricius, the formation of a urodaeal sinus, and the regular occurrence of a cloacal fenestra. *Am J Anat.* 30:163-302.
- Bódi I, Nagy N, Sinka L, Igyártó BZ, Oláh I. (2009). Novel monoclonal antibodies recognise guinea fowl thrombocytes. *Acta Vet Hung.* 57:239-46.
- Chung KS, Lillehoj HS, Jenkins MC. (1991). Avian leucocyte common antigens: molecular weight determination and flow cytometric analysis using new monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol.* 28:259-73.
- Dascher CC. (2007). Evolutionary biology of CD1. *Curr Top Microbiol Immunol.* 314:3-26.
- Dunon D, Allioli N, Vainio O, Ody C, Imhof BA. (1999). Quantification of T-cell progenitors during ontogeny: thymus colonization depends on blood delivery of progenitors. *Blood.* 93:2234-43.
- Ekino S, Matsuno K, Kotani M. (1979). Distribution and role of lymph vessels of the bursa Fabricii. *Lymphology.* 12:247-52.
- Felföldi B, Imre G, Igyártó B, Iván J, Mihalik R, Lackó E, Oláh I, Magyar A. (2005). In ovo vitelline duct ligation results in transient changes of bursal microenvironments. *Immunology.* 116:267-75.
- Funk PE, Palmer JL. (2003). Dynamic control of B lymphocyte development in the bursa of fabricius. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 51:389-98. Review.
- Funk PE, Pifer J, Kharas M, Crisafi G, Johnson A. (2003). The avian chB6 alloantigen induces apoptosis in DT40 B cells. *Cell Immunol.* 226:95-104.
- Glick B, Chang TS, Jaap RG. (1956). The bursa of Fabricius and antibody production in the domestic fowl. *Poultry Sci.* 35:2245-2250.

- Glick B. (1988). Bursa of Fabricius: development, growth, modulation, and endocrine function. *CRC Critic Poult Biol.* 1:107-131.
- Houssaint E, Diez E, Pink JR. (1987). Ontogeny and tissue distribution of the chicken Bu-1a antigen. *Immunology.* 62:463-70.
- Houssaint E, Lassila O, Vainio O. (1989). Bu-1 antigen expression as a marker for B cell precursors in chicken embryos. *Eur J Immunol.* 19:239-43.
- Houssaint E, Mansikka A, Vainio O. (1991). Early separation of B and T lymphocyte precursors in chick embryo. *J Exp Med.* 174:397-406.
- Igyártó BZ, Nagy N, Magyar A, Oláh I. (2008). Identification of the avian B-cell-specific Bu-1 alloantigen by a novel monoclonal antibody. *Poult Sci.* 87:351-5.
- Jaffredo T, Gautier R, Eichmann A, Dieterlen-Lièvre F. (1998). Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development.* 125:4575-83.
- Jaffredo T, Gautier R, Brajeul V, Dieterlen-Lièvre F. (2000). Tracing the progeny of the aortic hemangioblast in the avian embryo. *Dev Biol.* 224:204-14.
- Jeurissen SH, Janse EM. (1998). The use of chicken-specific antibodies in veterinary research involving three other avian species. *Vet Q.* 20:140-3.
- Kim IJ, You SK, Kim H, Yeh HY, Sharma JM. (2000). Characteristics of bursal T lymphocytes induced by infectious bursal disease virus. *J Virol.* 74:8884-92.
- Koskinen R, Göbel TW, Tregaskes CA, Young JR, Vainio O. (1998). The structure of avian CD5 implies a conserved function. *J Immunol.* 160:4943-50.
- Kothlow S, Morgenroth I, Graef Y, Schneider K, Riehl I, Staeheli P, Schneider P, Kaspers B. (2007). Unique and conserved functions of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) in the chicken. *Int Immunol.* 19:203-15.
- Krummel MF, Allison JP. (1996). CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med.* 183:2533-40.
- Lampisuo M, Arstila TP, Liippo J, Lassila O. (1998). Expression of chL12 surface antigen is associated with cell survival in the avian bursa of Fabricius. *Scand J Immunol.* 47:223-8.
- Lassila O, Eskola J, Toivanen P. (1979). Prebursal stem cells in the intraembryonic mesenchyme of the chick embryo at 7 days of incubation. *J Immunol.* 123:2091-4.
- Lassila O. (1989). Emigration of B cells from chicken bursa of Fabricius. *Eur J Immunol.* 19:955-8.

- Le Douarin NM, Houssaint E, Jotereau FV, Belo M. (1975). Origin of hemopoietic stem cells in embryonic bursa of Fabricius and bone marrow studied through interspecific chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72:2701-5.
- Lee SH, Lillehoj HS, Park MS, Baldwin C, Tompkins D, Wagner B, Del Cacho E, Babu U, Min W. (2011). Development and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive with chicken CD80. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 34:273-9.
- Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol.* 14:233-58. Review.
- Lupetti M, Dolfi A, Giannessi F, Michelucci S. (1986). A contribution to the study of the histogenesis of the bursal lymphoid follicles in *Gallus domesticus*. *Anat Anz.* 162:83-92.
- Ly N, Danzl NM, Wang J, Zajonc DM, Dascher CC. (2010). Conservation of CD1 protein expression patterns in the chicken. *Dev Comp Immunol.* 34:123-32.
- Masteller EL, Larsen RD, Carlson LM, Pickel JM, Nickoloff B, Lowe J, Thompson CB, Lee KP. (1995a). Chicken B cells undergo discrete developmental changes in surface carbohydrate structure that appear to play a role in directing lymphocyte migration during embryogenesis. *Development.* 121:1657-67.
- Masteller EL, Lee KP, Carlson LM, Thompson CB. (1995b). Expression of sialyl Lewis(x) and Lewis(x) defines distinct stages of chicken B cell maturation. *J Immunol.* 155:5550-6.
- Minkó K. (2005). Molecular aspect of haemotopoietic stem cell emergence in the avian embryo. Doctori thesis. p.26.
- Nagy N, Magyar A, Dávid C, Gumati MK, Oláh I. (2001). Development of the follicle-associated epithelium and the secretory dendritic cell in the bursa of Fabricius of the guinea fowl (*Numida meleagris*) studied by novel monoclonal antibodies. *Anat Rec.* 262:279-92.
- Nagy N, Magyar A, Tóth M, Oláh I. (2004a). Quail as the chimeric counterpart of the chicken: morphology and ontogeny of the bursa of Fabricius. *J Morphol.* 259:328-39.
- Nagy N, Magyar A, Tóth M, Oláh I. (2004b). Origin of the bursal secretory dendritic cell. *Anat Embryol (Berl).* 208:97-107.
- Nagy N. and Oláh I. (2010). Experimental evidence for the ectodermal origin of the epithelial anlage of the chicken bursa of Fabricius. *Development.* 137:3019-23.
- Naukkarinen A, Sorvari TE. (1984). Involution of the chicken bursa of Fabricius: a light microscopic study with special reference to transport of colloidal carbon in the involuting bursa. *J Leukoc Biol.* 35:281-90.
- Oláh I, Glick B. (1978). The number and size of the follicular epithelium (FE) and follicles in the bursa of Fabricius. *Poult Sci.* 57:1445-50.

- Oláh I, Glick B, Törö I. (1986). Bursal development in normal and testosterone-treated chick embryos. *Poult Sci.* 65:574-88.
- Oláh I, Glick B. (1987). Bursal secretory cells: an electron microscope study. *Anat Rec.* 219:268-74.
- Oláh I, Kendall C, Glick B. (1992). Differentiation of bursal secretory-dendritic cells studied with anti-vimentin monoclonal antibody. *Anat Rec.* 233:111-20.
- Oláh I, Glick B. (1995). Dendritic cells in the bursal follicles and germinal centers of the chicken's caecal tonsil express vimentin but not desmin. *Anat Rec.* 243:384-9.
- Oláh I, Gumati KH, Nagy N, Magyar A, Kaspers B, Lillehoj H. (2002). Diverse expression of the K-1 antigen by cortico-medullary and reticular epithelial cells of the bursa of Fabricius in chicken and guinea fowl. *Dev Comp Immunol.* 26:481-8.
- Olson WC, Ewert DL. (1990). Markers of B lymphocyte differentiation in the chicken. *Hybridoma.* 9:331-50.
- Orkin SH, Zon LI. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell.* 132:631-44.
- Paramithiotis E, Ratcliffe MJ. (1993). Bursa-dependent subpopulations of peripheral B lymphocytes in chicken blood. *Eur J Immunol.* 23:96-102.
- Paramithiotis E, Ratcliffe MJ. (1994). B cell emigration directly from the cortex of lymphoid follicles in the bursa of Fabricius. *Eur J Immunol.* 24:458-63.
- Paramithiotis E, Ratcliffe MJ. (1996). Evidence for phenotypic heterogeneity among B cells emigrating from the bursa of fabricius: a reflection of functional diversity? *Curr Top Microbiol Immunol.* 212:29-36.
- Pardanaud L, Altmann C, Kitos P, Dieterlen-Lievre F, Buck CA. (1987). Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development.* 100:339-49.
- Pharr T, Oláh I, Bricker J, Olson W.C., Ewert D, Marsh J, Glick B. (1995). Characterization of a Novel Monoclonal Antibody, EIV-E12, Raised against Enriched Splenic Ellipsoid-Associated Cells. *Hybridoma.* 14:51-57.
- Pifer J, Robison D, Funk PE. (2002). The avian ChB6 alloantigen triggers apoptosis in a mammalian cell line. *J Immunol.* 169:1372-8.
- Pink JR, Rijnbeek AM. (1983). Monoclonal antibodies against chicken lymphocyte surface antigens. *Hybridoma.* 2:287-96.

- Pink JR, Vainio O, Rijnbeek AM. (1985). Clones of B lymphocytes in individual follicles of the bursa of Fabricius. *Eur J Immunol.* 15:83-7.
- Ratcliffe MJ. (1985). The ontogeny and cloning of B cells in the bursa of Fabricius. *Immunol. Today.* 6:223-227.
- Ratcliffe MJ, Lassila O, Pink JR, Vainio O. (1986). Avian B cell precursors: surface immunoglobulin expression is an early, possibly bursa-independent event. *Eur J Immunol.* 16:129-33
- Ratcliffe MJ, Lassila O, Reynolds J, Pink JR, Vainio O. (1987). A re-evaluation of the function of the bursa of Fabricius. *Prog Clin Biol Res.* 238:3-14.
- Reynaud CA, Mackay CR, Müller RG, Weill JC. (1991). Somatic generation of diversity in a mammalian primary lymphoid organ: the sheep ileal Peyer's patches. *Cell.* 64:995-1005.
- Reynolds JD. (1987). Mitotic rate maturation in the Peyer's patches of fetal sheep and in the bursa of Fabricius of the chick embryo. *Eur J Immunol.* 17:503-7.
- Romano N, Baldassini MR, Abelli L, Aita M, Mastrolia L. (1996). Ultrastructural study on the plical epithelium of the bursa of Fabricius in chick embryos: influence of partial decerebration and hypophyseal allografts. *J Anat.* 188:29-41.
- Rothwell CJ, Vervelde L, Davison TF. (1996). Identification of chicken Bu-1 alloantigens using the monoclonal antibody AV20. *Vet Immunol Immunopathol.* 55:225-34.
- Sayegh CE, Demaries SL, Pike KA, Friedman JE, Ratcliffe MJ. (2000). The chicken B-cell receptor complex and its role in avian B-cell development. *Immunol Rev.* 175:187-200. Review.
- Schneider K, Kothlow S, Schneider P, Tardivel A, Göbel T, Kaspers B, Staeheli P. (2004). Chicken BAFF--a highly conserved cytokine that mediates B cell survival. *Int Immunol.* 16:139-48.
- Tamminen P, Toivanen A, Toivanen P. (1973). Density gradient separation of chicken thymus cells. *Eur J Immunol.* 3:521-3.
- Tarakhovsky A, Kanner SB, Hombach J, Ledbetter JA, Müller W, Killeen N, Rajewsky K. (1995). A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science.* 269:535-7.
- Toivanen P, Toivanen A. (1973). Bursal and postbursal stem cells in chicken. Functional characteristics. *Eur J Immunol.* 3:585-95.
- Tregaskes CA, Bumstead N, Davison TF, Young JR. (1996). Chicken B-cell marker chB6 (Bu-1) is a highly glycosylated protein of unique structure. *Immunogenetics.* 44:212-7.

- Vainio O, Dunon D, Aïssi F, Dangy JP, McNagny KM, Imhof BA. (1996). HEMCAM, an adhesion molecule expressed by c-kit+ hemopoietic progenitors. *J Cell Biol.* 135:1655-68.
- Varki A. (1994). Selectin ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:7390-7. Review.
- Veromaa T, Vainio O, Jalkanen S, Eerola E, Granfors K, Toivanen P. (1988). Expression of B-L and Bu-1 antigens in chickens bursectomized at 60 h of incubation. *Eur J Immunol.* 18:225-30.
- Warner NL, Szenberg A, Burnet FM. (1962). The immunological role of different lymphoid organs in the chicken. I. Dissociation of immunological responsiveness. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 40:373-87.
- Weber WT. (2000). In vitro characterization of chB6 positive and negative cells from early avian embryos. *Cell Immunol.* 204:77-87.
- Weinstein PD, Mage RG, Anderson AO. (1994). The appendix functions as a mammalian bursal equivalent in the developing rabbit. *Adv Exp Med Biol.* 355:249-53.